

**Aus dem
Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde**

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Jochen A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg**

**BESTIMMUNG DER PROLIFERATIONSAKTIVITÄT VON
PLATTENEPITHELKARZINOMEN DES OROPHARYNX**

**EINE HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG MIT DEN MONOKLONALEN
ANTIKÖRPERN Ki-S2 UND Ki-S11 UND DER METALLOPROTEINASE 9**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich der Medizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michaela Ax

aus Siegen

Köln 2008

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg**

am 27.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. A. Teymoortash
1. Korreferent:	Prof. Dr. J. Rüschhoff

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Patientenkollektiv	4
2.2.	Erhebung klinischer Daten	4
2.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	6
2.4.	Herstellung und Vorbehandlung der Präparate	7
2.4.1.	Objektträgerbeschichtung	7
2.4.2.	Anfertigung und Vorbehandlung der Schnitte	8
2.4.3.	Antigendemaskierung	8
2.4.4.	Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode	9
2.5.	Quantifizierung der angewandten Antikörper	12
2.6.	Statistische Methoden	13
3.	Ergebnisse	14
3.1.	Geschlecht und Alter	14
3.2.	Histologische Grading und TNM-Klassifikation	15
3.3.	Therapie	17
3.4.	Expression von Ki-S2 und Ki-S11	18
3.5.	Bestimmung der Tumorzellproliferation	20
3.6.	Prognose der Tumorpatienten und Korrelation mit dem Proliferationsindex der Tumorzellen	23
3.7.	Untersuchungen mit der Metalloproteinase 9	28

4.	Diskussion	29
4.1.	Plattenepithelkarzinome der oberen Luft- und Speisewege	29
4.2.	Das Oropharynxkarzinom	30
4.3.	Behandlung des Oropharynxkarzinoms	32
4.4.	Prognostische Faktoren beim Oropharynxkarzinom	34
4.4.1	Proliferationsmarker	35
4.4.2.	Einführung des monoklonalen Antikörpers Ki-67	35
4.5.	Monoklonale Antikörper Ki-S11 und Ki-S2	38
4.6.	Matrix-Metalloproteinasen	41
4.6.1.	Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9)	42
4.7.	Immunhistochemie im Vergleich mit anderen Untersuchungsmethoden	43
4.8.	Schlussfolgerungen und Ausblick	45
5.	Zusammenfassung	47
6.	Literaturverzeichnis	50
7.	Anhang	69
8.	Lebenslauf	72
9.	Danksagung	74
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	76
11.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	77

1. Einleitung

Bei sechs Prozent aller Krebserkrankungen weltweit handelt es sich um Malignome des Kopf-Hals-Bereichs (Colnot et al., 2001, 2003). Hierbei sind Plattenepithelkarzinome mit einer Häufigkeit von über 90% vertreten (Marur et al., 2008; Black et al., 1997). Nach Angaben der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister erkranken in Deutschland ca. 10000 bis 12000 Patienten pro Jahr an einem Karzinom der oberen Luft- und Speisewege, wobei die Inzidenz zunimmt (Worral 1995; Hindle et al., 1996).

Nach Larynxkarzinomen bilden Oropharynxkarzinome die zweithäufigste Gruppe der malignen Tumore der oberen Luft- und Speisewege. Die Prognose der Patienten mit diesen Malignomen ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von durchschnittlich 20-35% im Vergleich zu anderen Karzinomen der letztgenannten Region mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50% relativ schlecht (Fontana et al., 1993; Wiesmeth et al., 2003; Howell et al., 2005). Die schlechte Prognose der Oropharynxkarzinome erklärt sich in erster Linie aus einer hohen Inzidenz regionärer Lymphknotenmetastasierung von 50-85% (Werner et al., 2002). Beim primär unter kurativem Ansatz behandelten Oropharynxkarzinom stellen die in den ersten zwei Jahren nach Abschluss des primären Behandlungsblocks lokal und lokoregionär auftretenden Rezidive eine zusätzliche Limitierung der Lebenserwartung dar (Hemprich und Müller, 1989; Ferlito et al., 2001).

Die Behandlung von Oropharynxkarzinomen unterliegt einer ständigen Entwicklung. Dennoch ist kaum eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten in den letzten Jahren zu beobachten. Bei T1- bis T4-klassifizierten Karzinomen des Zungengrundes beispielsweise beträgt insgesamt die 5-Jahres-Überlebensrate mit einer primären Behandlung mit einer kombinierten Radiochemotherapie und Induktionschemotherapie mit

taxolhaltigen Schemata durchschnittlich ca. 65%. Im Vergleich zur chirurgischen Resektion mit anschließender adjuvanter Bestrahlung hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate des gleichen Patientenkollektivs um lediglich ein Prozent innerhalb des in den letzten zwei Jahrzehnten zu beobachteten Follow-up verbessert (Parsons et al., 2002).

Ein rechtzeitiges Erkennen des Karzinoms wird zum einen durch die relative Symptomarmut im Anfangsstadium, zum anderen aus Mangel an Compliance seitens der Erkrankten verhindert (Jones, 1992). Die mit dem chronischen Alkoholkonsum vieler Erkrankter verbundene besondere soziale und persönliche Situation ist häufig Ursache dafür, dass sich die Patienten erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium in ärztliche Behandlung begeben (Hoffmann und Heher, 1983). Daher befindet sich die überwiegende Anzahl der Patienten bei Diagnosestellung bereits in einem schlechten Allgemeinzustand bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium mit lokoregionärer Metastasierung (Jones und Stell, 1991).

Als wichtiger prognostischer Faktor für Karzinome der oberen Luft- und Speisewege gilt das nach der TNM-Klassifikation ermittelte Tumorstadium (Wittekind et al., 2006). Anhand TNM-Klassifikation und histopathologischem Grading können Kenntnisse über Größe und Differenzierungsgrad des Tumors sowie Vorkommen regionärer Lymphknoten- und Fernmetastasen gewonnen werden. Über die biologische Aggressivität der Neoplasie kann anhand der genannten Klassifikationen jedoch keine genaue Aussage gemacht werden (Holm, 1982; Merkel und McGuire, 1990). Patienten mit Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege, die sich in vergleichbaren Tumorstadien befinden, können einen sehr variierenden Krankheitsverlauf haben und auf gleiche Therapieschemata unterschiedlich ansprechen (Jones et al., 1994; Roland et al., 1994).

Vor diesem Hintergrund ist es von Bedeutung, eine auf den einzelnen Patienten abgestimmte Therapie durchzuführen. Ein Therapieschema kann nur dann individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmt werden, wenn genaue Informationen hinsichtlich des biologischen Verhaltens des Karzinoms bekannt sind. Dieses lässt sich mit Kenntnis über die Wachstumsrate des Karzinoms besser beschreiben (Esser et al., 1994). Die Wachstumsrate kann am Anteil proliferierender Zellen, der Dauer des Zellzyklus und dem Apoptoseanteil manifestiert und durch die Immunantwort des Patienten und die Therapie beeinflusst werden (Roland et al., 1994). Die Proliferationsaktivität eines malignen Tumors kann Hinweise auf das Ansprechen des Malignoms auf Chemo- und Strahlentherapie geben (Hall et al., 1988; Brown und Gatter, 1990). Somit könnte mit der Kenntnis über den Proliferationsgrad eines Karzinoms eine genauere prognostische Aussage für den einzelnen Patienten getroffen werden.

Mit Hilfe von Proliferationsmarkern ist es bereits gelungen, Untersuchungen hinsichtlich der Proliferationsaktivität an verschiedenen Malignomen z. B. bei Non-Hodgkin Lymphomen (Buechler et al., 1995), Mamma- (Schulze et al., 1996) und Hypopharynxkarzinomen (Kuropkat et al., 1998) durchzuführen. Mit der damit gewonnenen Information bezüglich der Proliferationsaktivität der einzelnen Karzinome konnten korrelierende Aussagen zum Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten getroffen werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, retrospektiv die prognostische Relevanz der Tumorzellproliferation beim Oropharynxkarzinom zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird unter Einsatz der monoklonalen Antikörper Ki-S2 und Ki-S11 sowie der Metalloproteinase 9 (MMP-9) die Proliferationsaktivität dieser Karzinome immunhistochemisch untersucht. Eine Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und Proliferationsaktivität könnte für die betroffenen Patienten bezüglich genauerer prognostischer Aussagen von großer Relevanz sein.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden 75 Patienten retrospektiv hinsichtlich des klinischen Verlaufs sowie histologisch anhand von Tumorpräparaten untersucht. Die Patienten befanden sich im Zeitraum 15.04.1998 bis 31.03.2002 mit einem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx im Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner) in Behandlung. Achtzehn der Patienten wurden im Jahre 1998, sechzehn im Jahre 1999, fünfundzwanzig im Jahre 2000, vierzehn im Jahre 2001 und zwei im Jahre 2002 behandelt.

2.2. Erhebung klinischer Daten

Die Erhebung klinischer Daten erfolgte retrospektiv aus den archivierten Patientenakten. Neben Alter und Geschlecht der Patienten waren eine Reihe klinischer und histologischer Daten von Bedeutung. Diese wurden durch Daten aus Nachsorgeuntersuchungen der klinikeigenen Tumorsprechstunde komplettiert. Um möglichst lückenlose Krankheitsverläufe zu erlangen, wurden darüber hinaus betreuende ärztliche Kollegen sowie Angehörige kontaktiert. Die dadurch recherchierten Daten konnten im Einverständnis der Befragten zur Ergänzung der Krankengeschichte genutzt werden. Zudem wurde eine Befragung beim entsprechenden Meldeamt zur Vervollständigung fehlender Angaben durchgeführt.

Bei der Erstdiagnostik wurden zunächst Daten bezüglich des Tumorareals und der Tumorgröße mittels Inspektion, Palpation, Endoskopie und Sonographie erhoben. An weiteren Bildgebungen wurde eine Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) der Halsregion durchgeführt. Durch

die histologische Untersuchung mindestens einer Probeexzision wurde die Tumorentität endgültig gesichert und zum Datum des histologischen Befundes als Tumorerst diagnose festgelegt. Anhand der Angaben zur makroskopisch klinischen Tumorausdehnung erfolgte die Klassifikation des T-Stadiums. Hierzu wurde Material der Befunde der bildgebenden Diagnostik und der sorgfältig dokumentierten Operationsberichte herangezogen.

Die Oropharynxkarzinome wurden anhand der international anerkannten TNM-Tumorklassifikationskriterien der UICC (Union International Contré le Cancer) eingeteilt (Wittekind et al., 2006).

Die Beurteilung des initialen klinischen Lymphknotenstatus (N-Stadium) erfolgte durch Inspektion, Palpation und sonographische Beurteilung der Halsweichteile und in einigen Fällen durch eine CT. Eine Lymphknotenmetastasierung wurde entweder durch zytologische Aufarbeitung einer Lymphknotenbiopsie oder durch die histologische Befundung der Neck dissection – Präparate festgestellt. In Einzelfällen wurde das Lymphknotenstaging sonographisch gestellt.

Im Rahmen der initialen Staging-Untersuchung erfolgte die Suche nach Fernmetastasen mit Röntgen oder CT des Thorax, ggf. ergänzt durch eine Abdomensonographie oder –CT sowie Skelettszintigraphie.

Die Durchführung des histopathologischen Gratings erfolgte wie üblich am Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. R. Moll).

Die weitere Dokumentation des Krankheitsverlaufs nach Erstdiagnose schloss die lokale Tumorkontrolle und Untersuchung auf Fernmetastasierung ein. Als Rezidiv wurde das Wiederauftreten eines Oropharynxkarzinoms an der Primärlokalisation gewertet. Zur weiteren lokalen Tumorkontrolle gehörte die

regelmäßige Betrachtung des Lymphknotenstatus. Die Nachsorgeuntersuchung bestand aus einer HNO-ärztlichen Spiegeluntersuchung, Palpation und Inspektion der ursprünglich vom Tumor betroffenen Region und des Halses. In einigen Fällen beinhaltete die Nachsorge zudem eine endoskopische Untersuchung der Schleimhäute der oberen Luft- und Speisewege und wurde ergänzt durch eine MRT oder CT des Halses und des Thorax. Der Beobachtungszeitraum beinhaltet das Zeitintervall vom Datum der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der letzten aktuellen Information über den Krankheitsverlauf des Patienten, definiert durch den Stichtag (17.10.2005) oder den Tod des Patienten. Dieses Zeitintervall bildete die Grundlage zur Schätzung der Überlebensraten nach der Methode von Kaplan und Meier (1958).

2.3. Immunhistochemische Untersuchungen

Es wurden routinemäßig formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 75 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx untersucht.

Die Präparate wurden immunhistochemisch mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 untersucht, welche im Institut für Hämatopathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. H. Wacker) entwickelt wurden.

Der Antikörper Ki-S2 erkennt das proliferationsassoziierte Antigen p100 mit einem molekularen Gewicht von ca. 100 kDa (Rudolph et al., 1999). Dieses Antigen wird in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert. Bei Ki-S2 handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper der Immunglobulinklasse IgG 1. Die Aktivierung dieses Proteins erfolgt durch Phosphorylierung. Seine Halbwertszeit beträgt etwa eine Stunde (Heidebrecht et al., 1997).

Der verwendete Antikörper Ki-S2 wurde aus einem Überstand von in Zellkulturen gezüchteten Hybridomen gewonnen. Diese wurden in RPMI 1640 Medium gezüchtet und mit 10%igem Kälberserum versehen. Die gezüchteten Zellen wurden auf ihre Reaktionsfähigkeit bezüglich proliferierender Zellen mit Hilfe von 4µm dicken Kryostatschnitten sowie Paraffinschnitten nahezu aller Typen menschlichen Gewebes geprüft (Heidebrecht et al., 1997). Der Zellkulturüberstand, bestehend aus Ki-S2-produzierenden Hybridomen, wurde in der Verdünnung 1:20 als Primärantikörper eingesetzt.

Bei dem zweiten in dieser Untersuchung eingesetzten monoklonalen Antikörper, Ki-S11, handelt es sich um einen Maus-Anti-Mensch-Antikörper, der ebenfalls der Immunglobulinklasse IgG 1 angehört. Dieser erkennt das nukleäre, proliferationsassoziierte Ki-67-Antigen (Rudolph et al., 1997), welches in allen Phasen des Zellzyklus außer der G0-Phase exprimiert wird. Auch Ki-S11 wurde aus dem Überstand von in Zellkultur gezüchteten Hybridomen, in Anlehnung an das Verfahren von Köhler und Milstein (1975) gewonnen (Kellner et al., 1997). Der Zellkulturüberstand der Ki-S11-produzierenden Hybridome wurde unverdünnt als Primärkörper eingesetzt.

Zur Proteindetektion von MMP-9 in den untersuchten Tumorpräparaten dient ein lyophilisierter monoklonaler Anti-Human MMP-9 – IgG-Antikörper, welcher von einer zuvor mit rekombinantem MMP-9 (rhMMP-9) sensibilisierten Maus stammt (Oncogene Products, USA).

2.4. Herstellung und Vorbehandlung der Präparate

2.4.1. Objektträgerbeschichtung

Die Objektträger (Superfrost Plus, Menzel) wurden mit Aceton (Merck, Darmstadt) gereinigt, anschliessend mit 3-Aminopropyl-triethoxy-Silane (Sigma,

Deisenhofen), einem Gewebeadhäsivum, das auf 2% (V/V) mit Aceton verdünnt wurde, beschichtet. An diesen Vorgang schloss sich das erneute Spülen mit Aceton und mehrmalig mit Aqua. dest. an, bevor die Objektträger für 48 Stunden bei 37° C inkubiert wurden.

2.4.2. Anfertigung und Vorbehandlung der Schnitte

Die 2 bis 4µm dicken Schnitte wurden mit dem Mikrotom (2050 Supercut, Reichert-Jung, Nussloch) von vorgekühlten Paraffinblöcken gefertigt. Die Schnitte wurden bei 40° C im Wasserbad entspannt, dann auf die beschichteten Objektträger aufgezogen und bei 37° C für die Dauer von 48 Stunden getrocknet.

Die Schnitte wurden in Rotihistol entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (3x5 Min. 100%, 5 Min. 90%, 5 Min. 70%) rehydriert. Als nächstes schloss sich das Neutralisieren der endogenen Peroxidaseaktivität an. Dieses erfolgte in 6ml 30%igem Wasserstoffperoxid in 200ml Methanol über die Dauer von 20 Minuten für die Antikörper Ki-S2 und Ki-S11 und über die Dauer von 30 Minuten für die MMP-9.

2.4.3. Antigen-Demaskierung

Die Antigen-Demaskierung wurde mit der Mikrowellenmethode nach Shi et al. durchgeführt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die Präparate wurden in einen Objektträgerhalter und dieser in eine handelsübliche mikrowellengeeignete Schale gegeben. Diese wurde mit frisch angesetztem Zitratpuffer (2,1g 0,01 M Zitronensäuremonohydrat , Carl Roth GmbH Karlsruhe, in 987 ml Aqua dest. und 13 ml 2M NaOH) vom pH Wert 6,0 randvoll gefüllt. Der Deckel wurde locker aufgelegt. Die anschließende effektive Kochzeit in der Mikrowelle (Philipps, Space cube 50) betrug 30 Minuten bei 720

Watt. Hierbei waren die Präparate permanent mit der Lösung bedeckt. Nach dem Kochvorgang wurden die Präparate noch in Objektträgerhalter und Schale befindlich fünf Minuten unter warmem und anschließend fünf Minuten unter kaltem fließendem Leitungswasser gespült. Daran schloss sich eine fünfminütige Spülung im Waschpuffer (0,15M NaCl; 0,05M Tris HCl, 1M NaOH) vom pH Wert 7,4 an.

2.4.4. Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode

Die Präparate wurden mit einem Fettstift umkreist. Es folgte dann die von Hsu und Mitarbeitern (1981) erstmals beschriebene Immunperoxidase-Methode, die wie folgt modifiziert durchgeführt wurde: Der Primärantikörper Ki-S2 wurde in der Verdünnung 1:20 mit Rinderalbumin (1g Rinderalbumin auf 100ml Tris NaCl, pH 7,4) in 100µl-Portionen auf die Präparate gegeben und für 60 Minuten in einer vorbereiteten Feuchtekammer bei 20° C inkubiert. Der Primärantikörper Ki-S11 wurde in der Verdünnung 1:200 aufgetragen und bei 20°C für 30 Minuten in der Feuchtekammer inkubiert. Im Anschluss wurde nach fünfminütiger Spülung mit Waschpuffer (die Präparate wurden hochkant in einer Küvette im Waschpuffer geschüttelt) der zweite Antikörper (Rabbit-Anti-mouse, E0354, Dako, Dänemark), an den Biotin kovalent gebunden ist, in der Verdünnung 1:200 mit Waschpuffer und BSA (Verdünnung BSA:Waschpuffer=1:10) aufgetragen. Hieran folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten in der Feuchtekammer bei Raumtemperatur, danach wiederum die kräftige Spülung mit Waschpuffer. Nun wurde der 1:100 in PBS (Biochrom AG) verdünnte Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin Komplex (K0377, Dako, Dänemark) aufgetragen.

Die Durchführung der Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode bei der immunhistochemischen Untersuchung mit der MMP-9 begann mit dem Auftragen eines Normalserums (Fa. Sigma-Aldrich GmbH, D-89502 Steinheim).

Hierfür wurde 1:10 verdünntes Ziegen-Normalserum auf das Schnittpräparat gegeben. Dieses reagierte für eine Dauer von 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit dem Präparat und wurde nach dieser Zeit lediglich vom Objektträger abgekippt, ohne eine folgende Spülung. Danach wurde der Primärantikörper (monoklonaler Anti-human-MMP-9-Antikörper, Clone 56-2A4, Oncogene Research Products, USA) auf das Präparat aufgetragen, es handelte sich hierbei um einen monoklonalen antihumanen MMP-9 Antikörper von der Maus in der Verdünnung 1:100. Die Inkubationszeit betrug 12 Stunden bei 4°C in der feuchten Kammer. Nach dieser Zeit wurde das Präparat für ca. 5 Minuten mit PBS-Lösung gespült, wonach das Auftragen des Zweitantikörpers (polyklonaler Anti-Maus-IgG, Dakro A/S, Denmark) erfolgte. Dieser Zweitantikörper war enzymgekoppelt und gegen das FC-Teil des Primärantikörpers gerichtet und wirkte nun als Antigen. Es wurde hier ein Maus IgG Antikörper aus der Ziege in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubationszeit betrug hier 30 Minuten in der feuchten Kammer, auch hier schloss sich die Spülung mit PBS über 5 Minuten an. Aufgrund höherer Flexibilität bezüglich der Vielzahl der Primärantikörper aus einer Spezies, die mit den gleichen markierten Zweitantikörpern kombiniert werden können, ist das hier durchgeführte Verfahren der direkten Methode, bei der a priori ein primär gekennzeichnete Primärantikörper verwendet wird, vorgezogen worden. Zudem weist die hier durchgeführte Untersuchungsmethode eine höhere Empfindlichkeit auf als das direkte Verfahren, da mehrere Zweitantikörper an einen Primärantikörper binden können, was eine Signalverstärkung bedeutet. Einer unerwünschten Reaktion bei der angewandten Methode, eine Kreuzreaktion der Zweitantikörper mit endogenen IgGs oder Kollagen, wurde mit der Vorbehandlung mit Kaninchennormalserum vorgebeugt. Nun folgte die Behandlung mit dem ABC-Komplex. Dieser besteht aus 1000µl PBS, 20µl Avidin und 20µl Biotin und wurde in dieser Zusammensetzung 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt. Der Enzymkomplex wurde in 100µl Mengen auf die Präparate aufgetragen und diese anschließend für 30 Minuten zur Inkubation in

der Feuchtkammer untergebracht. Danach schloss sich erneut eine Spülung mit PBS für die Dauer von 5 Minuten an.

Nach letztmaliger Spülung mit Waschpuffer wurde zur Visualisierung der Peroxidase das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Dihydrochlorid (DAB;Sigma) auf die Präparate pipettiert. Die Herstellung dieser Lösung erfolgte durch Auflösen einer DAB-Tablette in 18ml Waschpuffer und Hinzugabe von 18ul 30%iger Wasserstoffperoxidlösung unmittelbar vor dem Auftragen des Chromogens auf die Präparate. Nach ca. zehnminütiger Inkubation wurden die Präparate 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser und 5 Minuten in einer Küvette mit Aqua dest. gespült.

Diesem Vorgang schloss sich die Gegenfärbung der Schnitte mit Mayer's Hämalun (Merck), welches 1:1 mit Aqua dest. verdünnt wurde (die Präparate wurden 5 mal eingetaucht) und die Bläuung (8 Minuten in Leitungswasser) an, bevor die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 3x100%) dehydriert und vor dem Eindecken mit Corbit-Balsam (Hecht, Kiel-Hassee) für 10 Minuten in Rotihistol überführt wurden.

Die Spezifität der Immunreaktion wurde mit je 3 Positiv- und 3 Negativkontrollen (hier wurden statt des ersten Antikörpers je 100ul Waschpuffer aufgetragen) sicher gestellt. Hierbei handelte es sich um 2ul dicke Schnitte einer in Paraffin eingebetteten Tonsille.

Die Positivkontrollen der Tonsille wiesen eine Kernfärbung in den Zellen der Suprabasalzellschicht des mehrschichtig unverhornten Plattenepithels und auch der Zentroblasten-Zone der Keimzentren auf. Die Negativkontrollen besaßen keine Färbung.

2.5. Quantifizierung der angewandten Antikörper

Zunächst wurde jedes Präparat mittels Lichtmikroskop (Zeiss, West Germany) mit der Vergrößerung 25/0,45 (Plan 160/0,17) betrachtet. Bei dieser Vergrößerung konnte ein Überblick über das Präparat gewonnen und die für die folgende Auszählung relevanten Tumorareale bestimmt werden. Hierbei handelte es sich um Tumorzellareale eingebettet in gesundem Gewebe auf dem jeweiligen Präparat. Es folgte nun die Betrachtung dieser Abschnitte mit der Vergrößerung 40/0,65 (Plan 160/0,17). Die Zellen, deren Kerne eine Braunfärbung aufwiesen wurden als positiv gewertet. Die Farbintensität der Braunfärbung der als positiv gewerteten Zellen betrug schwach- bis dunkelbraun. Eine Braunfärbung musste eindeutig erkennbar sein. Dies galt für die Bearbeitung der Präparate mit beiden Antikörpern, sowohl für Ki-S11 als auch Ki-S2. Bei falsch positiven Ergebnissen, also Kernfärbungen von nicht proliferierenden Stromazellen bzw. falsch negativen, d. h. ungefärbten Mitosen wurde die Färbung der Präparate wiederholt. Pro Präparat wurden 1000 Tumorzellen mittels Handzählgerät (Ho-ma, A-Jaur, Schweden) ausgezählt und der Anteil positiver Zellen, also derjenigen, die eine Braunfärbung der Kerne aufwiesen, innerhalb dieser 1000 Zellen bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Form der Auswertung angewandt. Hierbei handelt es sich um die semiquantitative Auswertung, die von Shephard und Mitarbeitern 1988 mit hohen Korrelationen zwischen den beiden Auswertern durchgeführt wurde. Eine zum Vergleich durchgeführte quantitative Auswertung mit ca. 2000 ausgezählten Tumorzellen zeigte kaum Abweichungen in den Ergebnissen. Auch Gatter und Mitarbeiter (1986) und Sampson und Mitarbeiter (1992) konnten eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dieser Art der Auswertung erreichen. Diese Methode wird als durchaus praktikabel angesehen, vorausgesetzt die Untersucher haben ausreichende Erfahrung. Es wurden in der vorliegenden Arbeit stichprobenartig

semiquantitative Auswertungen mit vorher quantitativ durchgeführten Auswertungen verglichen und man stieß auf Ergebnisse im gleichen Fünfprozentintervall

Die Auswertung der Untersuchung mit MMP-9 erfolgte nach dem von Kurahara et al. (1999) beschriebenen Klassifizierungssystem mit folgender Einteilung:

0 = fast keine Färbung

1+ = Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazellen

2+ = Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mässige Färbung der Stromazellen

3+ = ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen

Die Klassifizierung die Tumor/Stromagrenze des Tumoreals auf den jeweiligen Schnittpräparaten. Betrachtet wurde die Braunfärbung der Tumor/Stromagrenze. Alle Präparate wiesen ein heterogenes Färbemuster mit leicht differierender Intensität auf, die Klassifizierungsstufen variierten auf den einzelnen Schnitten jedoch nicht.

2.6. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse aus den Antikörperuntersuchungen nach einem von Kearsley et al. (1990) beschriebenen Verfahren in die Kategorien „hochmaligne“ und „niedrigmaligne“ eingestuft. Als „hochmaligne“ galten die Karzinome mit einem Proliferationswert >50% bei der Ki-S11- und >30% bei der Ki-S2-Untersuchung. Die Kategorie „niedrigmaligne“ bildeten die Karzinome mit einem Proliferationswert ≤50% bei der Ki-S11- und ≤30% bei der Ki-S2-Untersuchung.

Die Verteilung von Variablen wurde durch die Angabe deskriptiver Kennwerte (Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum, Maximum) dargestellt. Die Höhe der Standardabweichung wurde in Klammern hinter dem Mittelwert angegeben. Tumorbedingte Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden nach der Methode von Kaplan und Meier (1958) bewertet. Die zeitlichen Verlaufskurven beziehen sich hierbei auf die Patienten, die bis zum Studienschlusstag, dem 17.10.2005, hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufs verfolgt werden konnten.

Die Darstellung von Unterschieden in den Überlebenszeitverläufen von Gruppen erfolgte mit dem Logrank-Test (Peto, R.; Peto, J.,1972). Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Statistikprogrammen SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 11.0 und Microsoft Excel 5.0.

3. Ergebnisse

3.1. Geschlecht und Alter

Die Patienten waren bei der Diagnosestellung zwischen 40 und 79 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 56,9 Jahre. Das Alter der 61 männlichen Patienten betrug bei Diagnosestellung zwischen 40 und 73 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 56,2 Jahren. Das Alter der 14 weiblichen Patienten betrug bei Diagnosestellung 46 bis 79 Jahre, Durchschnittsalter 60,1 Jahre.

3.2. Histologisches Grading und TNM-Klassifikation

Beim histopathologischen Grading fand sich die Differenzierungsgruppe G1 bei 12 (16,0%) der 75 Patienten, 47 (62,7%) Tumore wiesen den Differenzierungsgrad G2 auf, 14 (18,6%) Primärtumoren hatten histopathologisch den Differenzierungsgrad G3 und bei 2 (2,7%) Patienten wurde ein undifferenziertes, anaplastisches Oropharynxkarzinom mit dem Malignitätsgrad G4 diagnostiziert (Tabelle 1 und 5).

Differenzierungsgrad	G1	G2	G3	G4
Anzahl der Patienten (n)	12	47	14	2
Prozentualer Anteil (%)	16,0	62,7	18,6	2,7

Tabelle 1: Grading für die 75 untersuchten Oropharynxkarzinome

Achtzehn (24,0%) der Oropharynxkarzinome wurden als T1 eingestuft, 20 (26,7%) wurden als T2, 14 (18,7%) als T3 und 23 (30,7%) als T4 eingestuft (Tabelle 2, 5).

T-Klassifikation	T1	T2	T3	T4
Anzahl der Patienten (n)	18	20	14	23
Prozentualer Anteil (%)	24,0	26,7	18,7	30,7

Tabelle 2: T-Klassifizierung für die 75 untersuchten Oropharynxkarzinome

Die Überprüfung des Lymphknotenstatus ergab, dass von den 75 Patienten 29 (38,7%) keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen. Bei 46 (61,3%) Patienten wurden Lymphknotenmetastasen diagnostiziert, wobei 3 (4,0%) den Status N1, 39 (52,0%) den Status N2 und vier Patienten den Status N3 aufwiesen. Die

weitere Unterteilung des Status N2 zeigte 4 (5,3%) Patienten mit Status N2a, 17 (22,7%) Patienten mit N2b, 18 (24,0%) Patienten mit N2c (Tabelle 3, 5).

N-Klassifikation	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
Anzahl der Patienten (n)	29	3	4	17	18	4
Prozentualer Anteil (%)	38,7	4,0	5,3	22,7	24,0	5,3

Tabelle 3: N-Klassifizierung für die 75 untersuchten Oropharynxkarzinome

Die Untersuchung auf Fernmetastasierung ergab zum Zeitpunkt der Erstdiagnostizierung der Karzinome bei 6 Patienten (8,0%) den Status M1 mit Tochtergeschwulsten in der Lunge auf, 66 (88,0%) Patienten hatten zum Diagnosezeitpunkt keine Fernmetastasierung mit dem Vermerk M0. Bei 3 (4,0%) Patienten mit dem Aktenvermerk MX fand keine Fernmetastasierungsuntersuchung statt (Tabelle 5).

	T1	T2	T3	T4		n (%)
N0		1	1		M1	2 (2,7)
N0	10	8	3	5	M0	26(34,7)
N0				1	MX	1 (1,3)
N1	3				M0	3 (4,0)
N2a	1				MX	1 (1,3)
N2a	1	1			M0	2 (2,7)
N2a				1	M1	1 (1,3)
N2b	1	4	3	7	M0	15(20,0)
N2b			1	1	M1	2 (2,7)
N2c	1	5	5	5	M0	16(21,3)
N2c				1	M1	1 (1,3)
N2c				1	MX	1 (1,3)
N3	1	1	1	1	M0	4 (5,3)
Gesamt n (%)	18 (24,0)	20 (26,7)	14(18,7)	23 (30,7)	Gesamt n (%)	75 (100)

Tabelle 5: TNM-Klassifikation der untersuchten Karzinome

3.3. Therapie

Achtunddreißig (50,7%) der 75 Patienten wurden mit einer primären Radiochemotherapie behandelt. Bei 16 (42,1%) dieser Patienten folgte anschließend eine Laserresektion des Tumors.

Sechsenddreißig (48,0%) der 75 Patienten wurden primär chirurgisch versorgt. Hierbei erfolgte die operative Therapie bei 22 (61,1%) dieser 36 Patienten laserchirurgisch, bei 14 (38,9%) der chirurgisch versorgten Patienten wurde eine konventionelle Tumorresektion durchgeführt. Bei 3 (21,4%) der konventionell tumorresizierten Patienten folgte eine adjuvante Radiochemotherapie. Zwei (2,6%) der insgesamt 75 Patienten standen sowohl

einer operativen Behandlung als auch einer Radiochemotherapie ablehnend gegenüber.

Sechszehn (42,1%) der 38 primär radiochemotherapeutisch behandelten Patienten zeigten Residuen. Vierzehn (63,6%) der 22 laserchirurgisch behandelten und 11 (78,6%) der 14 konventionell operierten Patienten entwickelten nach Therapiebeginn innerhalb von 4 Monaten bis 2 Jahren Lokalrezidive. Bei 12 (48,0%) der 25 Patienten mit Rezidiv wurde erneut eine Laserresektionen durchgeführt, welcher eine erneute Radiochemotherapie folgte. Dreizehn (52,0%) der Patienten mit einem Tumorrezidiv erhielten eine Radiochemotherapie mit palliativer Intention.

Sechszwanzig (61,3%) Patienten erhielten eine Neck dissection, wobei bei 20 (43,5%) dieser 46 Patienten eine beidseitige Neck dissection vorgenommen wurde.

Ein Patient (2,6%) mit einer primären Radiochemotherapie und anschließender Laserresektion des Tumors erhielt in palliativer Intention eine intraarterielle Chemotherapie.

3.4. Expression von Ki-S2 und Ki-S11

Die immunhistochemische Markierung der durch Ki-S11 und Ki-S2 identifizierten Epitope gelang ohne Veränderung der morphologischen Strukturen der Präparate. Die Färbung reichte in ihrer Intensität von hellbraun bis schwarzbraun, die Nukleolen und Mitosen innerhalb der Zellkerne wurden in vielen Fällen besonders stark angefärbt.

Bei der Anwendung von Ki-S2 ließ sich eine leichte Hintergrundreaktion nicht vermeiden. Diese beeinträchtigte die Auswertung der Präparate jedoch nicht, da nur eindeutig gefärbte Nuklei als positiv gewertet wurden. Die mit Ki-S11

behandelten Präparate waren nahezu vollständig frei von unspezifischen Hintergrundreaktionen.

Die erhobenen Befunde der auswertbaren Schnittpräparate waren reproduzierbar, so dass stichprobenartig mehrfach ausgewertete Präparate in ihrer Proliferationsaktivität identisch bewertet wurden, was auch für die ebenfalls stichprobenartig durchgeführte ausschliessliche Schätzung der Proliferationsaktivität galt.

Im folgenden werden in den Abbildungen 1 und 2 zur Veranschaulichung mit den Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 angefärbte Schnittpräparate aufgeführt:

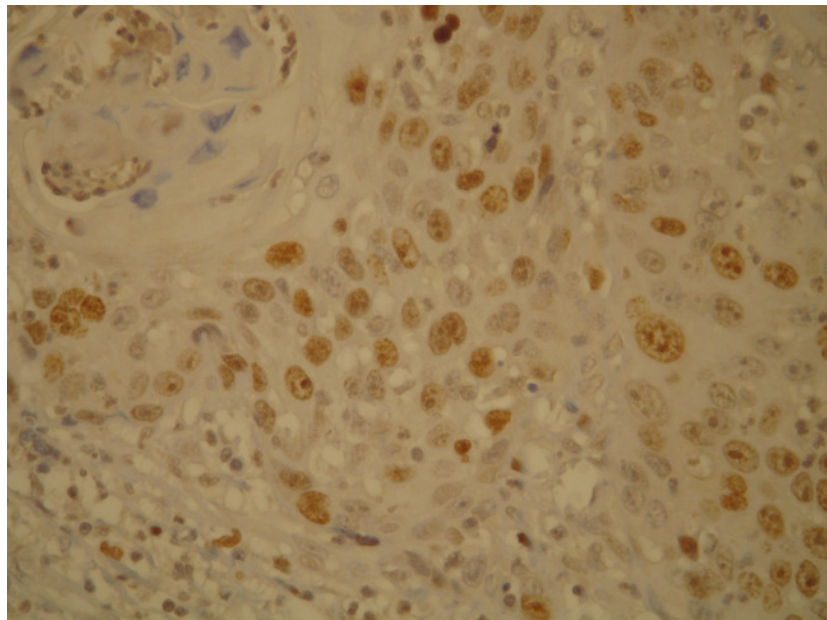


Abb. 1: Ausschnitt aus einem Schnittpräparat mit Anfärbung proliferierender Zellen aus der Untersuchung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S11. Es handelt sich um ein wenig differenziertes Plattenepithelkarzinom der Tonsilla palatina. Die quantitative Auswertung ergab einen Proliferationsanteil von 80% (Vergrößerung 400fach).

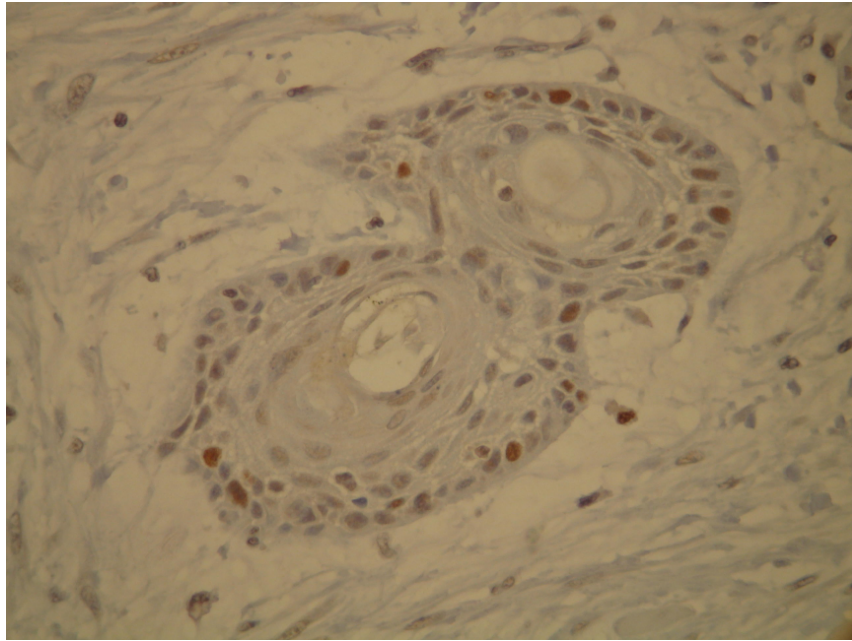


Abb. 2: Ausschnitt aus einem Schnittpräparat mit Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S2. Es handelt sich um Tumorzellnester eines Plattenepithelkarzinoms des Zungengrundes. Der Proliferationsanteil beträgt 50% (Vergrößerung 40fach).

3.5. Bestimmung der Tumorzellproliferation

Bei der Färbung der Tumore mit Ki-S2 ergaben sich Proliferationswerte von 5 - 80%. Der arithmetische Mittelwert lag bei 30,9% (17,5), der Median bei 30%. Der Anteil der angefärbten Zellen mit dem Antikörper Ki-S11 reichte von 10 - 90%. Hier betrug der arithmetische Mittelwert 52,3% (20,76) und der Median 50%. Somit war der mit Ki-S11 ermittelte Proliferationsindex im Durchschnitt ca. 20% höher als der Ki-S2 Index. Im folgenden sind die ermittelten Proliferationswerte für Ki-S2 und Ki-S11 tabellarisch sowie im Diagramm mit Darstellung der Anzahl von Präparaten, welche den gleichen Proliferationswert aufwiesen, dargestellt (Tabelle 6, 7).

Anzahl der Patienten	Prozentualer Anteil an Gesamtzahl der Patienten	Proliferationswert der Tumorzellen (%)
7	9,3	5
10	13,3	10
7	9,3	20
3	4,0	25
17	22,7	30
2	2,7	35
9	12,0	40
1	1,3	45
11	14,7	50
2	2,7	55
4	5,3	60
1	1,3	65
1	1,3	80

Tabelle 6: Proliferationswerte aus der Untersuchung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S2, n=75.

Anzahl der Patienten	Prozentualer Anteil an Gesamtzahl der Patienten	Proliferationswert der Tumorzellen (%)
2	2,7	10
1	1,3	15
5	5,3	20
2	2,7	25
6	6,7	30
1	1,3	35
5	6,7	40
1	1,3	45
20	66,7	50
1	1,3	55
11	14,7	60
5	6,7	70
1	1,3	75
11	14,7	80
3	4,0	90

Tabelle 7: Proliferationswerte aus der Untersuchung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S11, n=75.

Eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 und der Metalloproteinase 9 konnte in lediglich einem Fall gezeigt werden. Die Proliferationswerte aus den beiden Antikörperuntersuchungen Ki-S2 und Ki-S11 korrelierten (Korrelationskoeffizient 0,7). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5 dargestellt. Weitere Korrelationen konnten weder zwischen den Ergebnissen aus der Untersuchung mit Ki-S11 und MMP-9 (Korrelationskoeffizient=0,21) noch zwischen den Ergebnissen aus Ki-S2 und MMP-9 (Korrelationskoeffizient=0,13) festgestellt werden. Die Ergebnisse der

Untersuchung mit der MMP-9 sind in Kapitel 3.7. dargestellt.

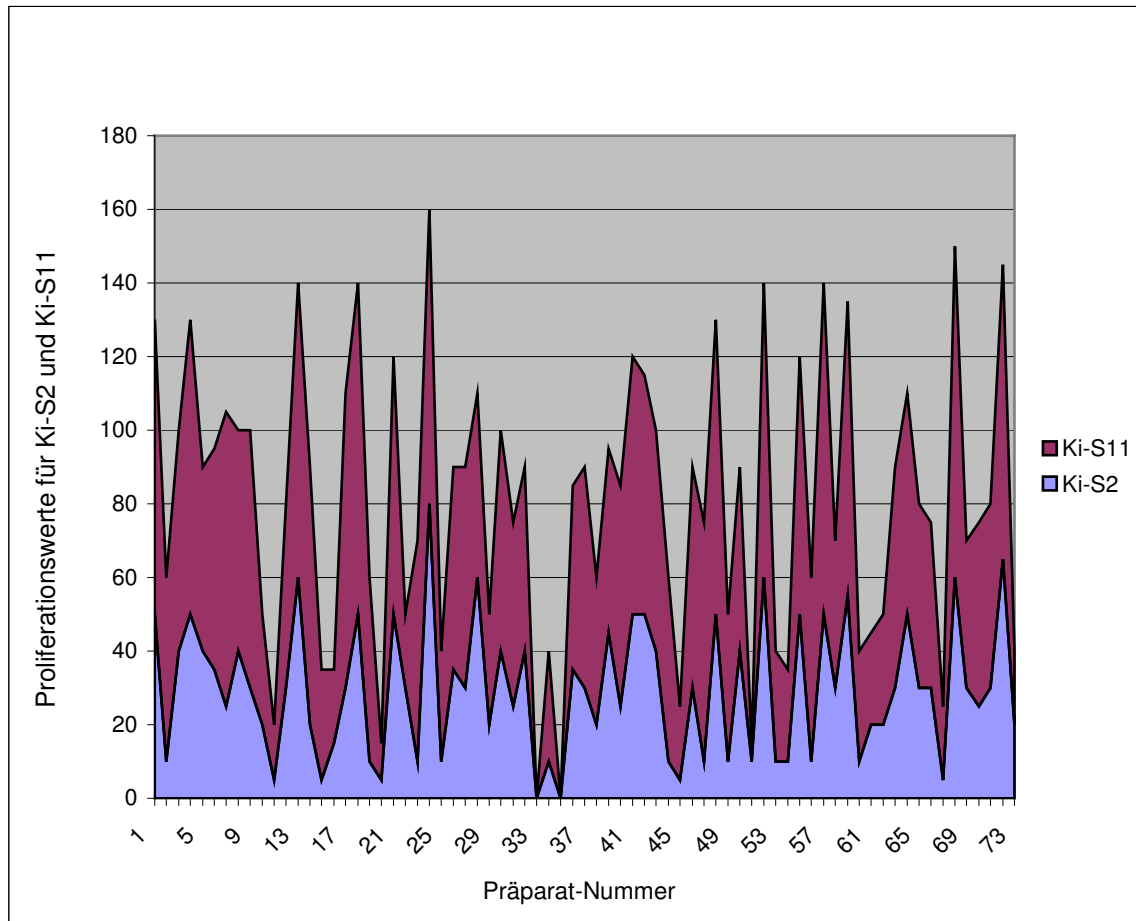


Abb. 5: Darstellung der Korrelation zwischen den Proliferationsindices aus den Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S11 und Ki-S2.

3.6. Prognose der Tumorpatienten und Korrelation mit dem Proliferationsindex der Tumorzellen

Der mittlere Zeitraum des Follow-up betrug 20,7 Monate. Der maximale Zeitraum des Follow-up betrug 48 Monate und minimale Zeitraum 4 Monate. Am Schlußtag des Beobachtungszeitraums waren 24 (32,0%) Patienten verstorben, 51 (68,0%) Patienten lebten.

Aus der Untersuchung mit Ki-S2 waren 31 (41,3%) Karzinome als „hochmaligne“ und 44 (58,7%) Karzinome als „niedrigmaligne“ einzustufen. Zweiunddreißig (42,7%) der mit Ki-S11 untersuchten Karzinome fielen in die Kategorie „hochmaligne“, 43 (57,3%) in die Kategorie „niedrigmaligne“. Insgesamt betrug die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit aller Patienten (ohne eine Einteilung in hoch- bzw. niedrigmaligne Karzinome) 5,38 Jahre (Abb. 6). Die Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zeigte außerdem, dass die Patienten mit einem als hochmaligne eingestuften Karzinom eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 4,96 Jahren (Ki-S11) bzw. 4,99 Jahren (Ki-S2) hatten, die Patienten mit einem als niedrigmaligne eingestuften Karzinom dagegen eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 5,91 (Ki-S11) bzw. 5,65 (Ki-S2) Jahren. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Proliferationsaktivität der Tumore und die Überlebenswahrscheinlichkeit proportional zueinander verhalten, die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$, Abb. 7, 8, 9).

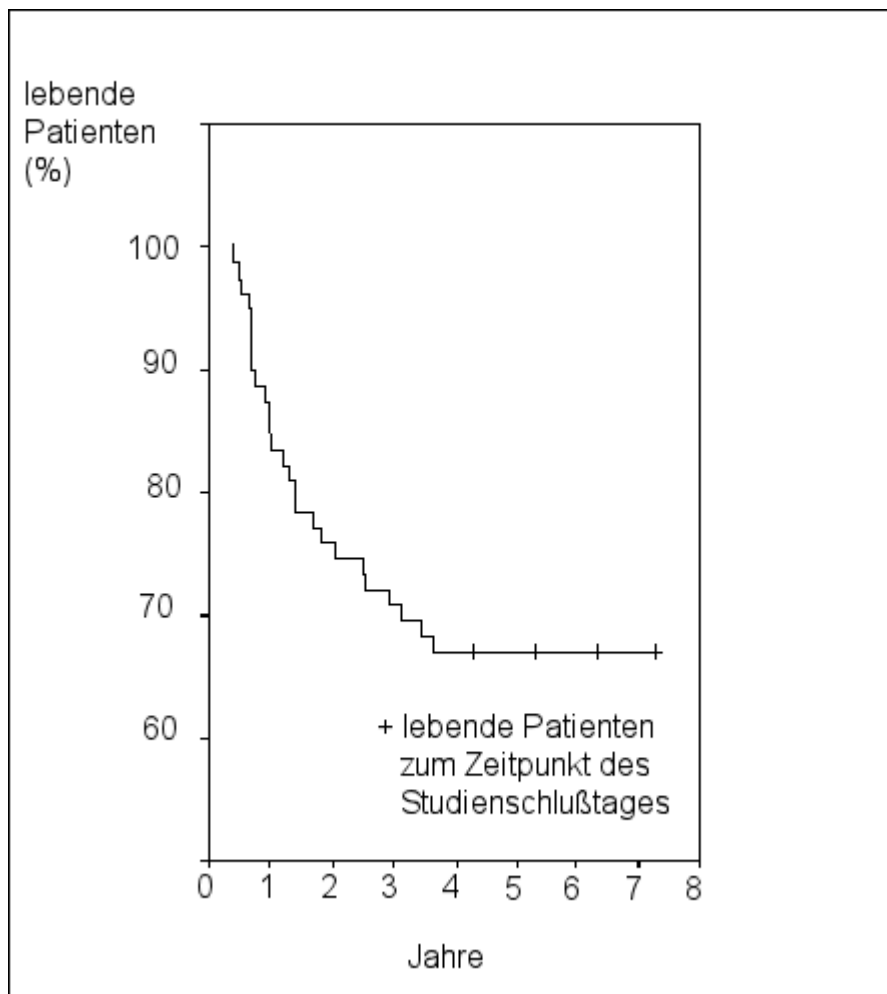


Abb. 6: Darstellung der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller 75 Patienten

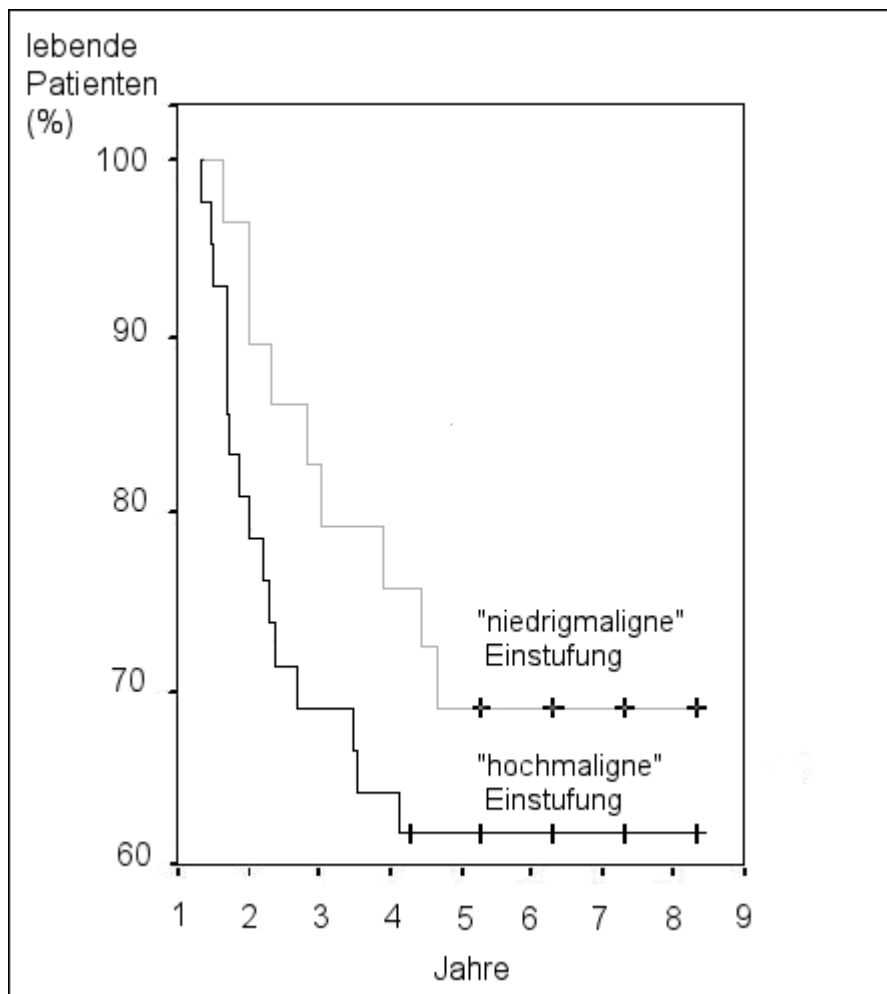


Abb. 7: Darstellung der unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten unter Einteilung der Tumore in hoch- ($>30\%$ Proliferationsaktivität) und niedrigmaligne ($\leq 30\%$ Proliferationsaktivität) bei der Versuchsdurchführung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S2.

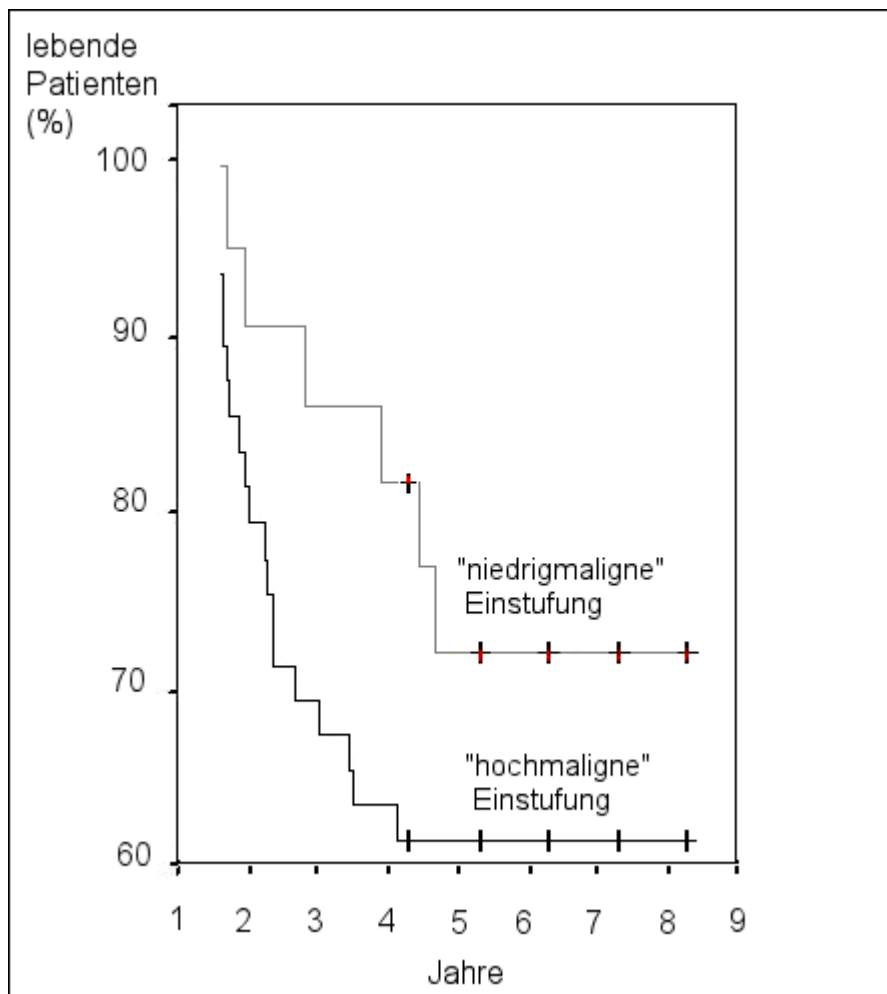


Abb. 8: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten unter Einteilung der Tumore in hoch- ($>50\%$ Proliferationsaktivität) und niedrigmaligne ($\leq 50\%$ Proliferationsaktivität) bei der Versuchsdurchführung mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S11.

3.7. Untersuchungen mit der Metalloproteinase 9

Die Untersuchung mit MMP-9 ergab folgende semiquantitative Ergebnisse:

Die Klassifizierung 1+ war bei 15 Schnittpräparaten vorzunehmen, 2+ bei 27 und 3+ bei 33 Präparaten. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Klassifizierung	1+	2+	3+
Anzahl der Patienten (n)	15	27	33
Prozentualer Anteil an Gesamtzahl der Patienten	20,0	36,0	44,0

Tabelle 8: Ergebnisse aus der histochemischen Untersuchung mit der Metalloproteinase 9 (MMP-9).

Die folgende Abbildung dient der Veranschaulichung eines immunhistochemisch bearbeiteten Präparates aus der Untersuchung mit der MMP-9.

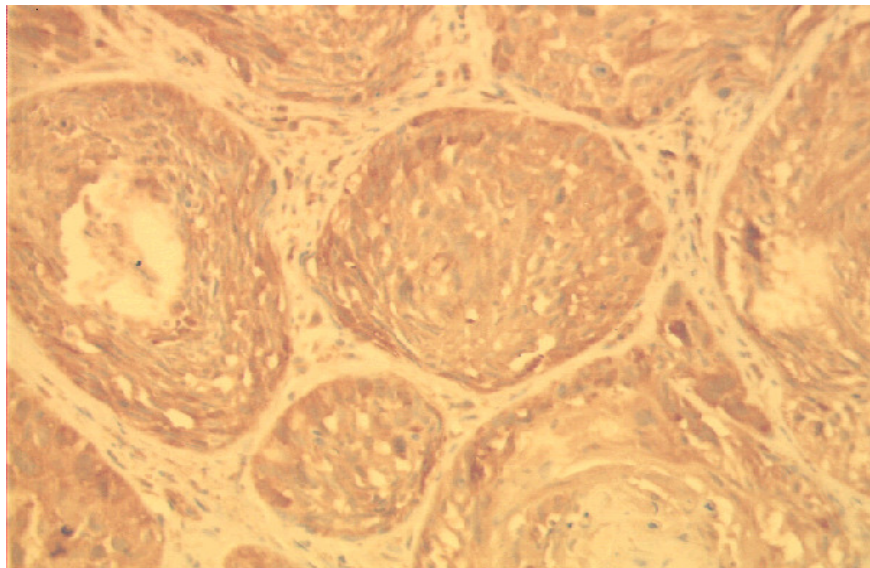


Abb. 9: Eine ausgedehnte Färbung der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes mit MMP-9. Diese immunhistochemische Färbung eines Oropharynxkarzinoms ist in die Kategorie 3+ einzustufen (Vergrößerung 40fach).

4. Diskussion

4.1. Plattenepithelkarzinome der oberen Luft- und Speisewege

Jährlich erkranken ca. 500000 Menschen weltweit an einem Karzinom der oberen Luft- und Speisewege. Männer erkranken mit einer Häufigkeit von 7,9% an einem Karzinom der letztgenannten Region, Frauen mit einer Häufigkeit von 3,9% (Parkin et al., 2005). Der Erkrankungsgipfel liegt in der 6. Lebensdekade. In der Bundesrepublik Deutschland treten jährlich rund 12000 Neuerkrankungen von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege auf (Lang et al., 2002).

Bei über 90% der malignen Kopf- und Halstumoren handelt es sich um Plattenepithelkarzinome (Black et al., 1997). Die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege hat in den letzten Jahrzehnten in Deutschland erheblich zugenommen (Esser et al., 2000). Bei 80000 Neuerkrankungen nehmen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches mit 5% aller neu auftretenden Karzinome den sechsten Platz in der Tumorstatistik in Europa und den USA ein (Parkin et al., 2005; Bier, 1991).

Als Risikofaktoren für diese Erkrankung gelten Alkohol- und Nikotinkonsum (Blot et al., 1988) und die berufliche Exposition organischer Lösungsmittel und Asbest (Berrino et al., 2003). Außerdem wird eine ätiologische Beteiligung von Epstein-Barr-Viren diskutiert (Worden et al., 2008; Thompson und Kurzrock, 2004). Als weiterer Risikofaktor für die Entwicklung von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege werden Infektionen mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) beschrieben (Klussmann et al., 2003). Insbesondere die mukotropen HPV-Typen 16 und 18 gelten als Hochrisikotypen. Besonders häufig lassen sich onkogene HPV-Typen in Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen nachweisen (Klussmann et al., 2001). HPV-positiven Karzinomen wird insgesamt eine deutlich bessere Prognose als HPV negativen Kopf-Hals-Karzinomen

zugeschrieben (Ritchie et al., 2003).

Karzinomerkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes stellen wie kaum eine andere Tumorerkrankung eine besonders schwerwiegende Erkrankung hinsichtlich der Ästhetik und Funktion dar. Aussehen, Mimik, Sprache, Kauen, Schlucken sowie natürliche Atmung sind oft in starkem Ausmaß durch die Karzinomerkrankung selbst sowie durch ihre Behandlung beeinträchtigt (Gingert, 1992).

Die vielfach schlechte Prognose für Patienten mit Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege ergibt sich aus der Primärlokalisation- und Ausbreitung des Karzinoms und dem regionären Lymphknotenmetastasen- und Fernmetastasenstatus zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Bei einer Vielzahl der betroffenen Patienten sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits lokoregionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden. Eine Fernmetastasierung im späteren Krankheitsverlauf, insbesondere in Lunge und Knochen, ist nicht selten (Werner et al., 2003; Tanaka et al., 1992). Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit diesen Malignomen beträgt ca. 50% (Fontana et al., 1993; Howell et al., 2005).

Die zweithäufigste Karzinomerkrankung im HNO-Bereich bilden nach den Larynxkarzinomen die Oropharynxkarzinome (Wiesmeth et al., 2003).

4.2. Das Oropharynxkarzinom

Oropharynxkarzinome treten mit einer weltweit unterschiedlichen Häufigkeit auf, die Inzidenzen betragen 0,2/100000 für Frauen in einigen Teilen der USA, 20-40/100000 und Jahr in Südostasien, bei Männern in Frankreich liegt die Inzidenz bei 15/100000. Die Inzidenz für bösartige Tumoren des Gaumenbogens und der Tonsille liegt in Deutschland bei 0,5/100000, die des

Zungengrundes bei 2,2/100000. In Deutschland erkrankten Männer 3-4mal häufiger als Frauen mit einem Häufigkeitsgipfel im 6.-7. Lebensjahrzehnt (Wiesmeth et al., 2003).

Neben den bereits erwähnten Risikofaktoren spielen ionisierende Strahlung, Immunsuppression und Vitaminmangel für die Pathogenese dieser Malignomkrankung eine Rolle.

Die 5-Jahres-Überlebensrate für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx beträgt insgesamt 20-35% (Howell et al., 2005). Trotz Fortschritten in der Diagnostik und Behandlung von Karzinomkrankungen der oberen Luft- und Speisewege waren innerhalb der letzten Jahrzehnte kaum Verbesserungen in Bezug auf die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten zu beobachten (Carvalho et al., 2005). Insbesondere aufgrund der hohen Inzidenz der lokoregionären Tumormetastasierung kommt es kaum zu einer Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit (Howell und Grandis, 2005). Die Erkrankung des Plattenepithelkarzinoms der Zunge bei der jungen Bevölkerung (<50. Lebensjahr) entwickelt sich zu einem weltweiten gesundheitlichen Problem (Sturgis et al., 2005).

Tonsillenkarcinome stellen mit 60% die häufigsten Malignome des Oropharynx dar und zeigen eine frühe Ulzerationsneigung. Diese Karzinome infiltrieren per continuitatem die vorderen und hinteren Gaumenbögen, die Zungenbasis, den weichen Gaumen, die laterale und hintere Rachenwand, die Flügelgaumengrube, den Naso- und Hypopharynx sowie den aufsteigenden Unterkieferast.

Zungengrundkarzinome wachsen in die Tiefe, nach lateral in die Tonsillengegend, in die Pharynxwand und Epiglottis, während Karzinome des weichen Gaumens und der Uvula harten Gaumen, Flügelgaumengrube,

Wangenschleimhaut, Tonsillennische und Zungenbasis infiltrieren. Zungengrundkarzinome weisen in 80-90% der Fälle bei Erstdiagnose Lymphknotenmetastasen auf, in 50% bilateral.

Bei Karzinomen des weichen Gaumens findet sich in 50% der Fälle ein Lymphknotenbefall. Die Inzidenzen von Fernmetastasen betragen bei Karzinomen des Zungengrundes und der Tonsille 10-20%. Am häufigsten ist die Lunge betroffen, gefolgt von Skelettsystem, Leber und Mediastinum (Wiesmeth et al., 2003).

4.3. Behandlung des Oropharynxkarzinoms

Zur Therapie von Oropharynxkarzinomen kommen Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie zum Einsatz. In frühen Stadien dieser Erkrankung werden Chirurgie oder Radiochemotherapie allein angewandt (Howald et al., 2000; Bootz, 2000). Im fortgeschrittenen resektablen Krankheitsstadium kommen multimodale Behandlungskonzepte zum Einsatz. Bei der Therapieplanung werden Tumorlokalisation- und -ausbreitung, Histologie und die TNM-Klassifikation berücksichtigt (Yokoshima et al., 1999). Darüberhinaus haben Allgemein- und Ernährungszustand der betroffenen Patienten Einfluss auf die Therapieplanung.

Die chirurgische Therapie umfasst verschiedene Methoden. Sie unterscheiden sich nach dem Einsatz unterschiedlicher Instrumente (Skalpell, Laser, elektrische Messer) und dem gewählten Zugangsweg.

Die komplette Resektion des Tumors einschließlich der Ausräumung möglicher lokoregionärer Lymphknotenmetastasen im Sinne eines kurativen Eingriffs ist das klassische Konzept der Tumorchirurgie. In seltenen Fällen kann organ- und funktionserhaltend operiert werden. In der Tumorchirurgie im Kopf-Hals-Bereich

sind schnell anatomische und funktionell-ästhetische Grenzen erreicht. Häufig sind ausgedehnte Tumorsektionen erforderlich mit resultierenden funktionell beeinträchtigenden Defekten, welche mit nachfolgenden rekonstruktiven Verfahren verschlossen werden können. In Fällen der nicht möglichen Resektion der Karzinome auf enoralem oder transoralem Weg wird häufig auf eine ausgedehnte Operation zugunsten der Radiochemotherapie verzichtet.

Palliativeingriffe dienen meist der Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung wichtiger Funktionen wie Atmung, Stimme und Schlucken. Sie können aber auch eine komplette organ- bzw. funktionserhaltende Primärresektion bei gleichzeitig nicht chirurgisch behandelbarer Fernmetastase umfassen.

Die chirurgische Behandlung eines Rezidivs gestaltet sich häufig komplizierter, zumal vielfach bei bestrahlten Patienten mit Wundheilungsstörungen gerechnet werden muss (Bootz et al., 2001).

Die chirurgische Behandlung des Primärtumors wird häufig durch die Ausräumung des Lymphabflussgebietes, der Neck dissektion, begleitet. Die Indikation zur Neck dissektion wird vielfach auch beim klinisch negativen Lymphknotenbefall gestellt, um okkulte Metastasen zu erkennen. Bei hohem Risiko für eine kontralaterale Metastasierung (z. B. beim Zungengrundkarzinom) oder bei Überschreiten der Mittellinie durch den Primärtumor wird eine bilaterale Neck dissektion durchgeführt (Jose et al., 2001; Dijkstra et al., 2001).

In den meisten Fällen erfolgt eine Strahlentherapie beim Oropharynxkarzinom mit kurativem Ziel. Die Radiotherapie findet Einsatz als alleinige Therapie, als komplementäre Maßnahme vor oder nach Operation, in der Regel in Kombination mit einer Chemotherapie mit dem Ziel der Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle. Durch die simultane Radiochemotherapie wird die

lokale Wirkung der Bestrahlungstherapie verstärkt. Als effektivste Substanzen gelten Cisplatin, Carboplatin, Mitomycin und 5-Fluorouracil (Malone et al., 2004; Schuller et al., 2002, Doweck et al., 2008). Entsprechend den Leitlinien der Konsensuskommission ist die postoperative Radiotherapie indiziert nach R1- oder R2-Resektion, Infiltration von Nachbarstrukturen durch den Primärtumor, bei Lymphknotenbefall im Stadium pN2 und pN3, sowie bei Lymphknotenkapselruptur und bei Diagnostizierung einer Lymphangiosis carcinomatosa. Darüberhinaus bestehen fakultative Indikationen zur postoperativen Bestrahlung für die Situationen pT1-3pN0 und pT1-3pN1 (Fortin et al., 2001; Mendenhall et al., 2003; Schultze-Mosgau et al., 2002).

Eine alleinige Chemotherapie wird bei Patienten mit Fernmetastasen oder lokoregionärem Rezidiv, bei denen eine chirurgische oder strahlentherapeutische Option nicht mehr besteht, angewandt. Hierbei werden die höchsten Remissionsraten mit einer Kombination mit Cisplatin und einer 5-Fluorouracil-Therapie erreicht (Fornari et al., 2002). Nach neuen beschreibenden Behandlungskonzepten wird im Stadium III/IV eine kombinierte Radio- und Chemotherapie und Induktionschemotherapie mit taxolhaltigen Schematas mit Komplettremissionsraten von bis zu 33% angewandt (Adelstein, 2003; Eckardt et al., 2007).

4.4. Prognostische Faktoren beim Oropharynxkarzinom

Als wichtige Charakteristika zur Beschreibung eines Karzinoms gelten die Grösse und Ausdehnung des Primärtumors und der Lymphknotenstatus (Okamoto et al., 2002). Diese werden mittels der TNM-Klassifikation (UICC, Wittekind et al., 2006) beschrieben. Darüberhinaus dient das histopathologische Grading zur Einteilung eines Karzinoms. Die exakten Zuordnungen des Differenzierungsgrades können fehlerbehaftet sein, da die aufgeführten Parameter der Differenzierung und Malignität ein mehr oder weniger

kontinuierliches Spektrum bilden und quantitativ nicht exakt definiert sind. Hierdurch basiert das Verfahren auf der subjektiven Deutung des Untersuchers, wobei die Übereinstimmung verschiedener Untersucher gering sein kann (Werner et al., 2002).

Prognostisch bedeutsam ist neben der TNM- und Grading-Einteilung eine genaue Aussage über die biologische Aggressivität des Tumorgewebes (Liu et al., 2003). Hierzu werden Bestimmungen mittels Proliferationsmarkern, insbesondere immunhistochemische Untersuchungen an in Paraffin eingebetteten Tumorschnittpräparaten durchgeführt (Rudolph et al., 1998, 1999).

4.4.1. Proliferationsmarker

Hierbei handelt es sich insbesondere um monoklonale Antikörper, die nukleäre Antigene erkennen, welche während bestimmter Phasen des Zellzyklus exprimiert werden. Durch die Untersuchungen, z. B. mit dem von Gerdes et al 1983 erstmals beschriebenen monoklonalen Antikörper Ki- 67 können exakte Bestimmungen über die Wachstumsfraktion in gesundem und in Tumorgewebe gemacht werden. So wie der oben genannte monoklonale Antikörper, der ein nukleäres Antigen erkennt, dass während aller Phasen ausser der G0-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, erkennen weitere entwickelte Antikörper Antigene, die während anderer Zyklusphasen exprimiert werden. Diese Antikörper können als Marker für proliferierende Zellen eingesetzt werden. Dies geschieht mittels immunhistochemischer Untersuchungsmethoden an in Paraffin eingebettetem Material.

4.4.2. Einführung des monoklonalen Antikörpers Ki-67

Die Einführung der monoklonalen Antikörper (Köhler et al., 1975) und die

Erstbeschreibung des Maus-Anti-Mensch-Antikörpers Ki-67 (Gerdes et al., 1983) machten es erstmals möglich, an kryokonserviertem Frischgewebe proliferierende Zellen immunhistochemisch darzustellen. Der Ki-67-Antikörper erkennt ein nukleäres Antigen, welches mit einem Maximum in der M-Phase in allen Phasen des Zellzyklus ausser der G0-Phase exprimiert wird (Sasaki et al., 1987; Gerdes et al., 1984). Mit dem Ki-67 Antikörper konnten proliferierende Zellen markiert und schnell und exakt Aussagen bezüglich der Wachstumsfraktion in gesundem und Tumorgewebe getroffen werden (Brown und Gatter, 1990; Hall and Woods, 1990; Gerdes et al., 1991).

In einer Vielzahl von Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 wurden Zusammenhänge zwischen der Proliferationsaktivität, dem klinischen Verlauf und der Prognose für den Patienten herausgestellt und unterschiedliche Therapieansätze abgeleitet. Hierbei wurden jedoch sehr wenig Untersuchungen für Karzinome im Kopf-Hals-Bereich durchgeführt, mehr Studien existieren für andere Tumorentitäten. Untersuchungen mit gutartigen Mamma-Tumoren hatten zum Ergebnis, dass eine erhöhte durch Ki-67 dargestellte Wachstumsfraktion der Zellen mit der Wahrscheinlichkeit für eine Entartung des Tumors korrelierte. Zudem zeigten Tumoren mit einer hohen Anzahl Ki-67-positiver Zellen eine bessere Reaktion auf Chemo- bzw. Radiotherapie (Lelle et al., 1987). Mammakarzinome wurden hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen den Mittelwerten der Wachstumsfraktion und des histologischen Gratings untersucht (Gerdes et al., 1986; Barnard et al., 1987; Bacus et al., 1989). Hier konnten auch Zusammenhänge zwischen mittels Ki-67 festgestellten Wachstumsfraktionen und histologischem Grading bei Non-Hodgkin-Lymphomen (Gerdes et al., 1984), Lungentumoren (Gatter et al., 1986) und kolorektalen Karzinomen (Porschen et al., 1989) erfasst werden. Bei der Untersuchung von Harnblasenkarzinomen korrelierte die Metastasierung des Tumors in die Lymphknoten mit einem hohen Ki-67-Index (Tjujiihashi et al., 1991). Eine Aussage über die Prognose des Patienten aufgrund der Ki-67-

positiven Zellen konnten für Magenkarzinome (Yonemura et al., 1991), Lymphome (Gerdes, 1986; Grogan et al., 1988; Hall et al., 1988; Miller et al., 1994) sowie Lymphknoten-negative Mamma-Karzinome (Sahin et al., 1991b; Wintzer et al., 1991) getroffen werden.

Nachteile des Arbeitens mit dem Ki-67-Antikörper ergeben sich daraus, dass das vom Antikörper erkannte Epitop bei der Fixierung des Tumorgewebes mit Formaldehyd oder Alkohol zerstört wird (Cattoretti et al., 1992; Kreipe et al., 1993a), d. h., es kann nur an Frischmaterial gearbeitet und somit keine grössere retrospektive Studie erstellt werden. In Studien können nur kleine Patientengruppen untersucht werden, womit eine statistische Signifikanz der Ergebnisse nur schwierig zu erhalten ist. Die vom Frischmaterial angefertigten Kryostatschnitte können nicht so dünn geschnitten werden wie die von in Paraffin eingebettetem Material. Die Morphologie bleibt bei den Kryostatschnitten schlechter erhalten, wodurch die Auswertung der Präparate erschwert wird. Grössere Untersuchungen mittels des Antikörpers Ki-67 als prognostischer Marker sind also nicht möglich (Brown und Gatter, 1990; Quinn und Wright, 1990).

Bei Epitopen anderer Antigene kommt es bei der Gewebefixierung mit Formaldehyd oder Alkohol zum sogenannten cross-linking, d. h., die Antigenstellen werden maskiert und sind für die Antikörperbindung nicht mehr zugänglich. Diese Proteinbrückenbildung kann durch eine Andauung mit Trypsin (Battifora und Kopinski, 1986) aufgelöst und somit die Antikörperbindungsstelle wiedergewonnen werden. Dieser Vorgang ist jedoch nicht bei allen betroffenen Epitopen erfolgreich (Evers und Uylings, 1994).

Bei der von Shi und Mitarbeitern (1991) entwickelten Methode zur Epitopdemaskierung werden die in einem Puffer befindlichen Präparate mikrowellenbehandelt. Den Grad der Demaskierung bestimmt hier vor allem der

pH-Wert des Puffers, die Zusammensetzung desselben scheint weniger entscheidend zu sein, häufig werden Aqua dest., Eisen-Thiocyanat-Lösung, Zinksulfat-Lösung und Zitratpuffer verwendet (Evers und Uylings, 1994). Liegt der pH-Wert zu weit im alkalischen Bereich, so besteht die Gefahr der Präparatablösung vom Objektträger. Hat der Puffer einen zu sauren pH, so können die Epitope zerstört werden (Shi et al., 1995). Bei einem pH-Wert von 6,0 und einer 0,01M Konzentration des Zitratpuffers können gewebeschonend gute Immunreaktionen erreicht werden (Gown et al., 1993; Taylor et al., 1994). Diese Konzentration wurde auch in dieser Untersuchung angewandt. Die Höhe der Temperatur und die Dauer der Erhitzung müssen individuell für jeden Antikörper und jedes Gewebe herausgefunden werden (Evers und Uylings, 1994).

Mit den monoklonalen Antikörpern MIB1 und MIB3, die das gleiche Antigen markieren, wie der Ki-67 Antikörper, gelang Cattoretti und Mitarbeitern 1992 erstmals mit der Mikrowellendemaskierung die Proliferationsaktivität an formalinfixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe zu bestimmen und somit grosse retrospektive Studien mit Proliferationsmarkern durchzuführen und in eine Beziehung zur Prognose des Patienten zu setzen. Mit Hilfe des von Kreipe und Mitarbeitern (1993b) entwickelten monoklonalen Antikörpers Ki-S5, welcher ebenfalls das Ki-67-Antigen erkennt und gegen die Formalinfixierung resistent ist, konnte eine prognostische Aussage nach Untersuchung der Proliferationsaktivität von Non-Hodgkin-Lymphomen treffen.

4.5. Monoklonale Antikörper Ki-S11 und Ki-S2

Einer der in dieser Studie verwendeten monoklonalen Antikörper, Ki-S11, markiert ebenfalls ein formalin-resistentes Antigen des Ki-67-Antikörpers. Es handelt sich hierbei um einen Maus-Anti-Mensch-Antikörper. Ki-S11 wurde wie Ki-S2 aus einem Überstand von in Zellkultur gezüchteten Hybridomen

gewonnen (Kellner et al., 1997). Das vom Antikörper Ki-S11 erkannte Antigen wird in allen Phasen des Zellzyklus ausser der G0-Phase exprimiert (Kreipe et al., 1993a). Es handelt sich bei Ki-S11 um ein IgG1-Immunglobulin.

Der zweite zur Untersuchung angewandte monoklonale Antikörper, Ki-S2, wie Ki-S11 im hämatopathologischen Institut der Universität Kiel entwickelt (Heidebrecht et al., 1997), erkennt ein 100kd schweres nukleäres Antigen, p100, (Rudolph et al, 1998), welches in der S, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird (Rudolph et al., 1999). Das Antigen, wird von einem Gen auf Chromosom 20q11.2 verschlüsselt (Tiemann et al., 2005). Es zeigte sich in einer von Heidebrecht und Mitarbeitern (1997) durchgeführten Studie, dass p100 bei verschiedenen malignen und benignen untersuchten Gewebearten von weniger als 40% der Ki-67-positiv gefärbten Zellen exprimiert wurde. Das p100 Protein wird von proliferierenden Zellen im Übergang der G1/S-Phase bis zum Ende der Zytokinese exprimiert (Heidebrecht et al., 1997). Während der Mitose ist das Protein eng mit dem Spindelpol und der Mitosespindel verbunden, während der S- und G2-Phase ist es diffus im Zellkern verteilt und unmittelbar nach Beendigung der Zytokinese wird das Protein abgebaut (Heidebrecht et al., 1997).

Rudolph und Mitarbeiter untersuchten 1999 retrospektiv 371 lymphknotennegative Mammakarzinome immunhistochemisch und mittels der Flow-Cytometrie mit Ki-S2 und Ki-S5 und fanden zum einen heraus, dass der prozentuale Anteil gefärbter Zellkerne von Ki-S2 geringer war als der Anteil Ki-S5 gefärbter Zellkerne, zum anderen konnte gezeigt werden, dass sich Ki-S2 als statistisch aussagefähigster prognostischer Faktor für die Gesamtüberlebenszeit, die krankheitsspezifische Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit erwies.

Die eng mit den Zellzyklusphasen S, G2 und M assoziierte Expression des p-

100-Proteins lässt eine wirklichkeitsnähere Darstellung der Proliferationsaktivität des Tumors vermuten (Rudolph et al., 1999).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit der Universität Magdeburg wurde das Proliferationsverhalten von Bronchial-, Colon-, Nieren-, Magen- und Urothelkarzinomen mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2, Ki-S5 sowie Ki-S4 hinsichtlich einer Korrelation mit dem histopathologischen Differenzierungsgrad untersucht. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hohen Proliferationsindices und wenig qualifizierten Karzinomen wie auch zwischen niedrig untersuchten Proliferationsraten und gut differenzierten Malignomen.

Eine von Kuropkat et al. 2000 veröffentlichte Arbeit zeigte einen Zusammenhang zwischen dem mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S11 und Ki-S1 untersuchten Proliferationsverhalten von Hypopharynxkarzinomen sowie deren Lymphknotenmetastasen und dem klinischen Verlauf der betroffenen Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Oropharynxkarzinome mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 auf ihre Proliferationsstärke untersucht. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung wurden auf eine mögliche Korrelation geprüft. Eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,71) ließ sich zwischen den Proliferationsindices der beiden monoklonalen Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 nachweisen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen hatten außerdem die Darstellung eines Zusammenhangs zwischen der 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit einem Oropharynxkarzinom und der mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 ausgewiesenen Proliferationsaktivität der Karzinome zum Ziel.

In der Literatur sind drei Einstufungen des Gesamtkollektivs der

Proliferationsgrößen in „hoch“, „mittel“ und „niedrig“ beschrieben (Kearsley et al., 1990). Dies bringt kleinere Fallzahlen und damit auch Probleme, statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen mit sich. Daher wurden in dieser Arbeit nur zwei Gruppen gewählt, um genügend große Patientenkollektive für die statistische Auswertung zu erreichen. Dieses Verfahren wurde z.B. auch von Kurokat et al. (1999) in einer immunhistochemischen Arbeit angewandt. In dieser Arbeit wurde eine Einteilung in „hochmaligne“ für Proliferationswerte $>50\%$ für Ki-S11 und $>30\%$ für Ki-S2 und in „niedrigmaligne“ für Proliferationswerte $\leq 50\%$ für Ki-S11 und $\leq 30\%$ für Ki-S2 vorgenommen.

Eine prognostische Aussagekraft in der Darstellung der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Zwar wiesen die Patienten mit einem als niedrig maligne eingestuften Karzinom in beiden Antikörperuntersuchungen eine höhere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf, als die mit einem als hochmaligne eingestuften Karzinom, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.6. Matrix-Metalloproteinasen

Die Invasion und Metastasierung maligner Tumoren setzt die Expression und Aktivierung proteolytischer Enzyme voraus, womit das Tumorwachstum sichergestellt und die physiologische Grenze, die Basalmembran, sowie die extrazelluläre Matrix zerstört werden können (Stetler-Stevenson et al., 1993; Mac-Dougall et al., 1995). Umbau und Erneuerungsprozesse umliegenden Gewebes sind abhängig von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Bei den MMPs handelt es sich um eine Familie von über 25 Enzymen, welche an einer Vielzahl biologischer Prozesse teilnehmen (Sternlicht und Werb, 2001). Proteasen spielen bei der Regulation der Angiogenese eine wichtige Rolle (Koblinski et al., 2000; Rovinsky et al., 1998). Matrix-Metalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, welche in sezernierter Form oder an Zellmembranen

gebunden vorkommen und über ein breites Substratspektrum verfügen, wobei es zu Überlappungen zwischen den einzelnen Proteinen kommt (Lehti et al., 2000). Aufgrund einer ehemals angenommenen Substratspezifität wurden die MMP in Kollagenasen, Stromolysine und Gelatinasen untergliedert. Diese Einteilung wurde nun weitgehend verlassen, um stattdessen die MMP mit einer Nummer zu versehen.

4.6.1. Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9)

Im Metastasierungsprozess von Gewebe wird insbesondere der Metalloproteinase 9 (MMP-9), einer Gelatinase, besondere Bedeutung zugesprochen (Kossa-Kowska et al., 1996; Himmelstein et al., 1994). MMP-9, früher 92 kDa Gelatinase genannt, kann Gelatin, Kollagen, Elastin, Fibronektin und weitere Proteine in der extrazellulären Matrix abbauen (Ishii et al., 2000; Kaur et al., 2002). Die MMP-9 (Gelatinase B) wird in epithelialen Zellen exprimiert, vor allem in Keratinozyten und in sekretorischen Granula, Neutrophilen und Eosinophilen gespeichert (Stahle-Bäckdal et al., 1993). In den meisten bislang erfolgten Untersuchungen wird eine Expression von MMP-9 in maligne verändertem Gewebe beschrieben, bei einigen zeigte sich eine Produktion in den Malignomzellen selbst (Matrisian et al., 1992; Shima et al., 1993). Die meisten Arbeiten konzentrieren sich jedoch auf eine Expression der MMP-9 im Stroma (Miyajima, 1995; Kawaka et al., 2002; Satoh et al., 1994). Einige Veröffentlichungen belegen zudem eine Expression von MMP-9 durch Neutrophile, Makrophagen oder Fibroblasten, welche sich in der Umgebung von Tumorzellen befanden (Zeng et al., 1995; Nielsen et al., 1996).

Es wurden bereits verschiedene Arbeiten mit der MMP-9 durchgeführt. In einer von Dünne et. al (2004) erschienenen Arbeit wurde bereits der Einfluss der MMP-9 auf die Metastasierungsneigung von Oropharynxkarzinomen untersucht. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der

Metastasierungsneigung lokaler Lymphknoten und der MMP-9 – Expression der Oropharynxkarzinome gezeigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung mittels MMP-9 erfolgte zur Frage eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Expression der MMP-9 und der durch die untersuchten monoklonalen Antikörper repräsentierten Proliferationsaktivität der Oropharynxkarzinome. Zusammenhänge zwischen der Höhe des MMP-9 Index und denen der Antikörper konnten in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden, die Korrelationskoeffizienten betrugen 0,13 für den Vergleich mit dem Antikörper Ki-S2 und 0,21 für die Untersuchung mit Ki-S11.

4.7. Immunhistochemie im Vergleich mit anderen Untersuchungsmethoden

Die immunhistochemische Untersuchung der Proliferationsaktivität weist im Vergleich zu anderen Methoden diverse Vorteile auf. Sie ist z. B. nicht so arbeitsintensiv wie vergleichsweise die mikroskopische Bestimmung von Mitosen in histologischen Präparaten. Diese ist bedingt durch die oft nicht eindeutig zu identifizierenden Mitosefiguren häufig fehlerbehaftet. Daher ist das ermittelte Ergebnis nicht selten schlecht reproduzierbar (Kreipe et al, 1993b). Ergebnisunterschiede entstehen außerdem durch die unterschiedliche Erfahrung des Untersuchers (Baak, 1990; Hall und Levison, 1990; Quinn und Wright, 1990). Zudem werden bei der Mitosezählung ausschließlich die Zellen in der Mitose (M-)Phase beachtet, während die Zellen, die sich in der G1-, S- oder G2-Phase befinden nicht berücksichtigt werden.

Der am häufigsten in der Literatur beschriebene proliferationsassoziierte prognostische Parameter ist der DNA-Gehalt der in der S-Phase befindlichen Zellen. Diese Untersuchungen führten jedoch bei Kopf- und Halskarzinomen zu

konträren Ergebnissen (Cappiello et al., 1995). Dies ist möglicherweise bedingt durch das Fehlen von objektiven Beurteilungskriterien (Koss et al., 1989). Die meist hierfür verwendete Flow-Cytometrie und die in-vitro-Bestimmung des 3H-Thymidin-Index sind kostenaufwendig und zeitintensiv. Zudem erfordern diese Untersuchungsmethoden eine aufwendige Laborausstattung (Yonemura et al., 1991). Beide Methoden sind für einen Routineeinsatz nur teilweise geeignet (Gatter et al., 1986; Hall und Levison, 1990; Quinn und Wright, 1990).

Die Histone H3 mRNA in-situ-Hybridisierung, eine Methode zur Bestimmung der Zellen in der S-Phase des Zyklus (Kotelnikov et al., 1997), ist arbeitsintensiv und störanfällig und ergab bislang keine statistisch signifikant prognostischen Aussagen.

Bei der AgNOR-Methode, mittels der die Nukleolus-organisierende Region durch eine Silberkolloidfärbung dargestellt wird, stehen lediglich subjektive Auswertungskriterien zur Verfügung. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse stark von der Schnittdicke des Präparats und der Hintergrundreaktion abhängen (Crocker et al., 1989).

Eine weitere Methode, die jedoch ebenfalls kostenintensiv ist und dazu invasiv am Patienten durchgeführt werden muss, ist die automatische Mikroskopbildanalyse, welche eine computergesteuerte morphologische Diagnostik möglich macht. Diese Methode liefert zwar objektiv reproduzierbare Ergebnisse (Esser et al., 1994), lässt jedoch keine Korrelation zwischen Nukleolus-organisierenden Regionen und der Prognose für den Patienten zu. Bei dieser Untersuchung werden dem Patienten die halogenierten Pyrimidine IdUrd oder BrdUrd infundiert. Es folgt der immunhistochemische Nachweis im Tumorgewebe. Die Ergebnisse sind von der jeweiligen intermittierenden Tumordurchblutung abhängig (Kotelnikov et al., 1995).

Unter Berücksichtigung der Nachteile der oben genannten Verfahren wurde für die vorliegende Arbeit die kostengünstige Methode der immunhistochemischen Markierung proliferationsassoziiierter Antigene mit monoklonalen Antikörpern gewählt.

Die Untersuchung wurde mit den an der Kieler Universität unter der Leitung von Professor Parwaresch entwickelten Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 durchgeführt. Die Immunhistochemie ist eine in der täglichen Routine schnell und einfach durchzuführende Untersuchungsmethode. Sie hat außerdem den Vorteil, dass vergleichsweise wenig Material für die Untersuchung notwendig ist. Zudem können bei der in-situ-Analyse proliferierende Tumorzellen von anderen proliferierenden Zellen unterschieden werden (Brown und Gatter, 1990; Hall und Levison, 1990; Quinn und Wright, 1990; Hitchcock, 1991; Sahin et al., 1991a).

Als nachteilig erweist sich bei der Immunhistochemie die Heterogenität der proliferierenden Zellen in einem Tumorzellklon. Dies könnte einen limitierenden Faktor der Untersuchungsmethode darstellen (Baak, 1990; Hall und Levison, 1990; Quinn und Wright, 1990). Ausserdem gilt für die Immunhistochemie wie für alle anderen Verfahren, bei denen der Tumor nicht in toto untersucht wird, dass der mittels Auszählung ermittelte Proliferationsindex die Proliferationsaktivität bestimmter Tumoreareale und nicht des gesamten Tumors repräsentiert.

4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität von malignen Tumoren ist eine etablierte Methode in der Onkologie. Sie ist bereits bei vielen Malignomen unter Einsatz von Proliferationsmarkern insbesondere in immunhistochemischen Untersuchungen erfolgreich zum Einsatz gekommen. Durch Kenntnis der

Proliferationsaktivität eines Malignoms könnte eine bessere Anpassung der Therapie im jeweiligen Tumorstadium und eine genauere Einschätzung der Prognose für den Patienten ermöglicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei neu entwickelte Proliferationsmarker, die monoklonalen Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 und die MMP-9, für die im Oropharynx lokalisierten Karzinome eingesetzt. Die Untersuchung erbrachte eine gute Darstellung der proliferierenden Zellen bei den jeweiligen Antikörpern. Die Auswertung erfolgte über ein semiquantitatives Verfahren. Es zeigte sich eine Korrelation der Proliferationsaktivität der Karzinome mit der Überlebensrate der Patienten, die Ergebnisse waren allerdings nicht statistisch signifikant. Dennoch ließen die Ergebnisse eindeutige Tendenzen erkennen.

Ziele weiterer Untersuchungen sollten sein, die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper Ki-S2 und Ki-S11 sowie MMP-9 bei anderen Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege einzusetzen. Bei Hypopharynxkarzinomen war der Einsatz von Ki-S11 als prognostischer Faktor bereits erfolgreich. Es sollten darüber hinaus weitere Marker zur Untersuchung der Proliferationsaktivität maligner Tumoren entwickelt werden. Weiterentwickelte Proliferationsmarker sollten nicht isoliert für Plattenepithelkarzinome, sondern eventuell auch für andere Tumorentitäten des Kopf-Hals-Bereiches analysiert werden. Durch diese Entwicklung soll eine bessere Prognose für die Betroffenen durch eine mit genauerer Kenntnis über die Malignität des Karzinoms individueller auf den Patienten abgestimmte Therapie erzielt werden.

5. Zusammenfassung

Oropharynxkarzinome bilden die zweithäufigste Gruppe der malignen Tumoren der oberen Luft- und Speisewege. Die Inzidenz beträgt zwischen 0,5 und 2 pro 100000 Einwohner pro Jahr und ist in den letzten 20 Jahren stetig gestiegen. Insbesondere das Auftreten von Oropharynxkarzinomen in der jüngeren Population hat zugenommen. Trotz neuer Therapieansätze zur Behandlung von Oropharynxkarzinomen hat sich in den letzten Jahrzehnten die 5-Jahres-Überlebensrate von durchschnittlich 25-35% kaum verbessert.

Durch die Erkrankung selbst und ihre Therapie sind häufig schwerwiegende Einbußen der Ästhetik und Funktion für den betroffenen Patienten verbunden. Zur Verbesserung der Lebensqualität und Prognose der betroffenen Patienten sind frühzeitiges Erkennen sowie eine genauere Bestimmung des Malignitätsgrades des Oropharynxkarzinoms von Bedeutung. Zur Einteilung dieser Malignome wird das TNM-System zur Stadieneinteilung nach der Klassifikation der WHO sowie das histomorphologische Grading genutzt. Oropharynxkarzinome im gleichen Stadium nach der oben genannten Klassifikation können unterschiedliche Verläufe und Prognose zeigen. Aufgrund der unvorhersagbaren klinischen Krankheitsverläufe und unterschiedlicher Ansprechraten auf verschiedene Behandlungsschemata ist nicht selten eine adäquate Prognoseeinschätzung nicht uneingeschränkt möglich.

Die immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit an einem homogenen Patientengut hatten zum Ziel, retrospektiv die prognostische Relevanz der Tumorzellproliferation von Oropharynxkarzinomen mittels neuer Proliferationsmarker zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die monoklonalen Antikörper Ki-S2 und Ki-S11 sowie die MMP-9 zur Bestimmung der quantitativen Wachstumsrate der Oropharynxkarzinome eingesetzt.

Zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten und dem ermittelten Proliferationsindex der Oropharynxkarzinome erfolgte eine semiquantitative Einteilung der Proliferationsgrößen. Dabei fielen die mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S2 untersuchten Karzinome mit einem Proliferationswert bis einschließlich 30% in die Kategorie „niedrigmaligne“. Die Oropharynxkarzinome mit einem Proliferationswert über 30% wurden in die Kategorie „hochmaligne“ eingestuft. Bei der Untersuchung der Karzinome mit dem Antikörper Ki-S11 wurde die Einteilung „niedrigmaligne“ für die Proliferationswerte bis einschließlich 50% und „hochmaligne“ für über 50-prozentige Proliferationswerte vorgenommen. Die nach Kaplan-Meier ermittelten Überlebensraten standen in proportionalem Verhältnis zur jeweils ermittelten Proliferationsaktivität, die Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz.

Die immunhistochemische Untersuchung der Oropharynxkarzinome mit der MMP-9 wurde zur Darstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Ergebnissen aus den Untersuchungen mit Ki-S11 und Ki-S2 durchgeführt. Eine Korrelation konnte jedoch weder zwischen den Ergebnissen der MMP-9 und Ki-S2 noch zwischen denen der MMP-9 und Ki-S11 Untersuchungen dargestellt werden.

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Immunhistochemie eine praktikable Methode zur Darstellung proliferierender Zellen im Tumorgewebe bietet. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse können nicht den Einsatz der oben genannten Antikörper als Prognosemarker für Oropharynxkarzinome ohne Vorbehalt unterstützen.

Zum weiteren Aufschluss hinsichtlich des biologischen Verhaltens von Oropharynxkarzinomen sind am vorhandenen Tumormaterial weitere

immunhistochemische Untersuchungen geplant. Es ist von Bedeutung, weitere Marker zur Bestimmung der Proliferationsaktivität von Oropharynxkarzinomen zu entwickeln, um den betroffenen Patienten eine bessere Prognose durch individuellere Therapie- und Diagnostik- und Nachsorgeschemata zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

Adelstein, D. J. (2003): Oropharyngeal cancer. The role of chemotherapy. Curr. Treat Options Oncol.: 3-13.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg). Krebs in Deutschland (1999): Selbstverlag, Saarbrücken.

Baak, J. P. A. (1990): Mitosis counting in tumors. Hum. Pathol. 21, 683-685.

Bacus, S. S., Goldschmidt, R., Chin, D., Moran, G., Weinberg, D., Bacus, J. W. (1989): Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. J. Pathol. 135, 783-792.

Barnard, N. J., Hall, P. A., Lemoine, N. R., Kadar, N. J. (1987): Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. J. Pathol. 152, 287-295.

Battifora, H., Kopinski, M. (1986): The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. J. Histochem. Cytochem. 34, 1095-1100.

Berrino, F., Richiardi, L., Boffetta, P., Esteve, J., Belletti, I., Raymond, L., Troschel, L., Pisani, P., Zubiri, L., Ascunce, N., Guberan, E., Tuyns, A., Terracini, B., Merletti, F., Milan JEM Working Group (2003): Occupation and larynx and hypopharynx cancer: a job-exposure matrix approach in an international case-control study in France, Italy, Spain and Switzerland. Cancer Causes Control. 14: 213-23.

Bier, J. (1991): Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich, In: Horch HH, Hrsg.

Praxis der Zahnheilkunde, Band 10/II: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, München, Urban & Schwarzenberg: 267-359.

Black, R. J., Bray, F., Ferlay, J., Parkin, D.M. (1997): Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. Eur. J. Cancer 33: 1075-1107.

Blot, W. J., McLaughlin, J. K., et al. (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 48: 3282-3287.

Bootz, F. (2000): Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches. Konsensusbericht, im Auftrag des Präsidiums der Deutschen Krebsgesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Laryngo-Rhino-Otol. 79: 350-65.

Bootz, F., Weber, A., Kleiner, S. (2001): Operative Therapie von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes mit besonderer Berücksichtigung der retrokonstruktiven Chirurgie. Onkologie 7: 513-521.

Brown, D. C. and Gatter, K. C. (1990): Monoclonal antibody Ki 67: its use in histopathology. Histopathology 17: 489-503.

Canto, M.T., Devesa, S.S. (2002): Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. Oral Oncol. 6: 610-7.

Capiello, J., Nicolai, P., Antonelli, A. R., Facchetti, F., Cadei, M., Cornacchiari, A., Grigolato, P. G. (1995): DNA-Index, cellular proliferative activity and nucleolar organizer regions in cancers of the larynx. Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 252: 353-358.

Carvalho, A. L., Nishimoto, I. N., Califano, J. A., Kowalski, L. P. (2005): Trends

in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int. J. Cancer*. 114: 806-816.

Cattoretti, G., Becker, M. H. G., Key, G., Duchrow, M., Schlüter, C., Galle, J., Gerdes, J. (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processes formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol*. 168: 357-363.

Colnot, D. R., Quak, J. J., Roos, J. C., de Bree, R., Wilhelm A. J., Snow, G. B., van Dongen, G. A. (2001): Radioimmunotherapie in patients with head and neck squamous cell carcinoma: initial experience. *Head Neck* 23: 559-565.

Colnot, D. R., Roos, J. C., de Bree, R., Wilhelm, A. J., Kummer, J. A., Hanft, G., Heider, K.-H., Stehle, G., Snow, G. B., van Dongen, G. A. (2003): Safety, biodistribution, pharmacokinetics and immunogenicity of 99m-Tc-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (biwatuzumab) in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 576-582.

Crocker, J., Boldy, D. A. R., Egan, M. J. (1989): How should we count Ag-NORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathol*. 158, 185-188.

Darzynkiewicz, Z. und Traganos, F. (1982): RNA content and chromatin structure in cycling and noncycling cell populations studied by flow cytometry. In: G. M. Padilla and K. S. McCarty. (Hrsg.), *Genetic expression in the cell cycle*, Academic Press, New York, 103-128.

Dijkstra, P. U., van Wilgen P. C., Buijs, R. P., Brendeke W., de Goede, C. J., Kerst, A., Koolstra, M., Marinus J., Schopping, E. M., Stuiver M. M., van de Velde, C. F., Roodenburg, J. L. (2001): Incidence of shoulder pain after Neck

dissection: A clinical explorative study for risk factors. Head Neck 23: 947-953.

Doweck, I., Robbins, K. T., Samant, S., Vieira, F. (2008): Intra-arterial chemoradiation for T3-4 oral cavity cancer: treatment outcomes in comparison to oropharyngeal and hypopharyngeal carcinoma. World J Surg. Oncol. Jan. 14;6: 2.

Dünne, A.A., Gröbe, A., Sesterhenn, A. M., Barth, P., Dalchow, C., Werner, J. A. (2004): Influence of metalloproteinases (MMP 9) on the metastatic behavior of oropharyngeal cancer. Anticancer Res., 25: 4129-34.

Eckardt, A., Sinikovic, B., Hofele, C., Bremer, M., Reuter, C. (2007): Preoperative paclitaxel/carboplatin radiochemotherapy for stage III/IV resectable oral and oropharyngeal cancer: seven-year follow-up of a phase II trial. Oncology 73: 198-203.

Esser, D., Meyer, W., Willgeroth, C., Motsch, C. (1994) : Die Feststellung prognoserelevanter Faktoren bei Patienten mit einem Hypo- oder Oropharynxkarzinom. HNO 42: 413-417.

Esser, D., Anke S., Roessner, A., Freigang, B. (2000): Second carcinomas in cancers of the mouth cavity, pharynx and larynx. Clinical, histopathologic and cell kinetic findings. Laryngo-Rhino-Otol.: 478-82.

Evers, P., Uylings, H. B. M (1994): Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. J. Histochem. Cytochem. 42: 1555-1563.

Ferlito, A., Shaha, A. R., Silver C. E., Rinaldo, A., Mondin, V. (2001): Incidence and sites of distant metastases from head neck cancer. ORL. J. Oto-Rhino-Laryngol. Relat. Spec. 63: 202-207.

Fontana, X., Dassonville, O., Neri, J., Vallicioni, J., Santini, J., Milano, G., Combon, P., Lapalus, F., Demard, F. (1993): Sedimentation rate and serum thymidine kinase activity: prognostic factors in squamous cell head and neck cancer. *Head Neck* 15: 425-432.

Fornari, G., Artusio, E., Mairone, L., Airoidi, M., Bongioannini, G., Amasio, E., Rosmino, C., Gabriele, P. (2002): Paclitaxel and carboplatin in neoadjuvant and concomitant radiochemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Tumori*. 88: 489-494.

Fortin, A., Allert, J., Albert, M., Roy, J. (2001): Outcome of patients treated with cobalt and 6 MV in head and neck cancers. *Head Neck* 23: 181-188.

Gatter, K. C., Dunnill, M. S., Gerdes, J., Stein, H., Mason, D. Y. (1986): New approach to assessing lung tumours in man. *J. Clin. Pathol.* 39: 590-593.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H. (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31: 13-20.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, Stein, H. H., Schwab, H., U., (1984a): Cellcycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67, *J. Immunol.* 133: 1710-1715.

Gerdes, J., Dallenbach, F., Lennert, K., Lemke, H., Stein, H. (1984): Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol. Oncol.* 2: 365-371.

Gerdes, J., Lelle, R. J., Pickartz, H., Heidenreich, W., Schwarting, R., Kurtsiefer, L., Stauch, G., Stein, H. (1986): Growth fractions in breast cancers determined

in situ with monoclonal antibody Ki-67. J. Clin. Pathol. 39: 977-980.

Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stanmer, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H. D. (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am. J. Pathol. 138: 867-873.

Gingert, B. (1992): Retrospektive epidemiologische Studie über Karzinome der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. Med. Diss. RWTH Aachen.

Gown, A. M., de Wever, N., Battiflora, H. (1993): Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. App. Immunohistochem. 1: 256.

Grogan, T. M., Lippman, S. M., Spier, C. M., Slymen, D. J., Rybski, J. A., Rangel, C. S., Richter, L. C., Miller, T. P. (1998): Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. Blood 71: 1157-1160.

Hall, P. A., Richards, M. A., Gregory, W. M., d'Ardenne, A. J., Lister, T. A. and Stansfeld, A. G. (1988): The prognostic value of Ki 67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J. Pathol. 154: 223-235.

Hall, P. A., Levison, D. A. (1990): Assessment of cell proliferation in histological material. J. Clin. Pathol. 43: 184-192.

Hall, P. A., Woods, A. L. (1990): Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. Cell Tissue Kinet. 23: 505-522.

Heidebrecht, H. J., Buck, F., Steinmann, J., Sprenger, R., Wacker, H. H., Parwaresch, R. (1997): p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2 and M. *Blood* 1997; 90: 226-33.

Hemprich, A., Müller, R. (1989): Long term-results in treating squamous cell carcinoma of the lip, oral cavity and oropharynx. *Int.J. Oral Maxillofac. Surg.* 18: 39-42.

Hermanek, P., Scheibe, O., Spiess, B., Wagner, G. (1987): TNM-Klassifikation maligner Tumoren UICC International Union Contre le Cancer. Springer, Berlin.
Hermanek, P., Scheibe, O., Spiess, B., Wagner, G. (1992): TNM Klassifikation maligner Tumoren UICC International Union Contre le Cancer. Springer, Berlin.

Hindle, I., Downer, M. C., Speight, P. (1996): The epidemiology of oral cancer. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33: 471-476.

Hitchcock, C. (1991) : Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am. J. Clin. Pathol.* 96: 444-446.

Ho, C. M., Lam, K. H., Wei, W. I., Yuen, P. W., Lam, L. K. (1993): Squamous cell carcinoma of the hypopharynx – analysis of treatment results. *Head Neck* 15: 405-412.

Hoffmann, L., Heher, W. (1983): Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle. *Dtsch. Med. Wschr.* 108: 1150-1152.

Holm, L. E. (1982): Cellular DNA amounts of squamous cell carcinomas of the head and neck region in relation to prognosis. *Laryngoscope* 92: 1064-1069.

Howaldt, H. P., Reicherts, M., Blecher, C. (2000): Mundhöhlenkarzinom.

Ergebnisse zur Befundung und Therapie im DÖSAK Tumorregister im Auftrag des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK). *Onkologie* 6: 573-583.

Howell, G. M., Grandis, J. R. (2005): Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 27: 710-717.

Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981): Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580.

Ishii, T., Asuwa, N. (2000): Collagen and elastin degradation by matrix-metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinase in aortic dissection. *Hum. Pathol.* 31: 640-6.

Jones, A. S., Stell, P. M. (1991): Squamous carcinoma of the posterior pharyngeal wall. *Clin. Oto-Laryngol.* 16: 462-465.

Jones, A. S. (1992): The management of early hypopharyngeal cancer: primary radiotherapy and salvage surgery. *Clin. Oto-Laryngol.* 17: 545-549.

Jones, A. S., Roland, N. J., Caslin, A. W., Cooke, T. G., Cooke, L. D., Forster, G (1994): A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Laryngol. Otol.* 108: 859-864.

Jose, J., Coatesworth, A. P., Johnson C., MacLennan, K. (2002): Cervical node metastases in squamous cell carcinoma: prospective analysis of prevalence and distribution. *J. Laryngol. Otol.* 116: 925-928.

Kaplan, E. L., Meier, P. (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Assoc. 53: 457-481.

Kaur, K., Zhu, K., Whittermore, M. S. et al. (2002): Identification of the active site of gelatinase B as the structural element sufficient for converting a protein to a metalloprotease. Biochemistry 41: 4789-97.

Kawata, R., Shimada, T., Maruyama, S., Hisa, Y., Takenaka, H., Murakami, Y. (2002): Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. Acta Oto-Laryngol. 122: 101-106.

Kearsley, J. H., Furlong, K. L., Cooke, R. A., Waters, M. J. (1990): An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. Br. J. Cancer 61: 821-7.

Kellner, U., Heidebrecht, H. J., Rudolph, P., Biersack, H., Buck, F., Dakowski, T., Wacker, H. H., Domanowski, M., Seidel, A., Westergaard, O., Parwaresch, R. (1997): Detection of topoisomerase IIa in cell lines and tissues: characterization of five novel monoclonal antibodies. J. Histochem. Cytochem. 45: 1-13.

Klussmann, J. P., Weissenborn, S., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Junghuelsing, M., Eckel, H. E., Dienes, H. P., Pfister, H., Fuchs, P. (2001): Prevalence, Distribution and viral load of human Papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. Cancer 92: 2875-2884.

Klussmann, H. P., Gultekin, E., Weissenborn, S., Wieland, U., Dries, V., Dienes, H. P., Eckel, H. E., Pfister, H., Fuchs, P. (2003): Expression of p16 Protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human

papillomavirus. Am. J. Pathol. 162: 747-753.

Koblinski, J. E., Ahram, M., Sloane, B. F. et al. (2000): Unraveling the role of proteases in cancer. Clin. Chem. Acta 291: 113-35.

Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.

Kossakowska A.E., Hutchcroft, S. A., Urbanski, S. J., Edwards, D. R. (1996): Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin`s lymphomas in humans. Br. J. Cancer 73: 1401-1408.

Kotelnikov, V., Coon, J. S., Taylor, S., Hutchinson, J., Panje, W., Caldarelli, D. D., LaFolette, S., Preisler, H. D. (1995): In vivo labeling with halogenated pyrimidines of squamous cell carcinomas and adjacent non-involved mucosa of head and neck region. Cell. Prolif. 28: 497-509.

Kotelnikov, V., Cass, L., Coon, J. S., Spaulding, D., Preisler, H. D. (1997): Accuracy of Histone H3 messenger RNA in situ hybridization for the assessment of cell proliferation in human tissues. Clin. Cancer Res. 3: 669-673.

Koss, L. G., Czerniak, B., Herz, F., Wersto, R. P. (1989): Flow cytometric measurement of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. Hum. Pathol. 20: 528-548.

Kovacs, A. F. (2002): Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome. Neue Mittel und Wege der Therapie. Books on Demand GmbH, Norderstedt: 7-14.

Kreipe, H., Heidebrecht, H. J., Hansen, S., Röhlk, W., Wacker, H. H., Tiemann, M., Radzun, H. J., Kubbies, M., Parwaresch, R. (1993a): A new proliferation associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am. J. Pathol.* 142: 3-10.

Kreipe, H., Wacker, H. H., Heidebrecht, H. J., Haas, K., Hauberg, M., Tiemann, M., Parwaresch, R. (1993b): Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67-antigen. *Am. J. Pathol.* 142: 1689-1694.

Kurahara, S., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Beppu, M., Hiraki, A., Takeuchi, H., Shirasuna, K. (1999): Expression of MMPs, MT-MMP and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation with tumorinvasion and metastasis. *Head Neck* 21: 627-638.

Kuropkat, C., Rudolph, P., Frahm, SO., Parwaresch, R., Werner, J. A. (1999): Proliferation marker Ki-S11 – a prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Virchows Arch.* 435: 590-5.

Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M. K., Schwenzer, K., Sautier, W., Chulolowski, M., Eckel R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Anrold, E., Kasenbauer W., Holzel, D. (2002): Clinical and epidemiological Data of patients with malignomas of the head and neck. *Laryngo-Rhino-otol.* 81: 499-508.

Lehti, K., Valtanen, H., Wickstrom, S. et al. (2000): Regulation of membrane-type-1-matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 275: 15006-13.

Lelle, R. J., Heidenreich, W., Stauch, G., Gerdes, J. (1987): The correlation of

growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 59: 83-88.

Lippert, B. M., Teymoortash, A., Folz, B. J., Werner, J. A. (2003): Wound healing after laser treatment of oral and oropharyngeal cancer. *Lasers in Medical Science* 18: 36-42.

Liu, M., Lawson, G., Delos, M., Jamart, J., Chatelain, B., Remacle, M., Marbaix, E. (2003): Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur. Arch. Oto-Rhinolaryngol.* 260: 28-34.

Malone, J. P., Stephens, J. A., Grecula, J. C. et al. (2004) : Disease control, survival and functional outcome after multimodal treatment for advanced-stage tongue base cancer. *Head Neck* 26: 561-572.

Marur, S., Forastiere, A. A. (2008): Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* 83: 489-501.

Matrisian, L. M. (1992): The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463.

Mendenhall, W. M., Amdur, R. J., Hinermann, R. W., Villaret, D. B., Sieman, D. W. (2003): Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am. J. Oto-Laryngol.* 24: 41-50.

Merkel, D. E., McGuire, W. L. (1990): Ploidy, proliferative activity and prognosis: DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 65: 1194-1205.

Miyajima, Y., Nakano, R., Morimatsu, M. (1995): Analysis of expression of

matrix metalloproteinase-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann. Oto-Rhino-Laryngol.* 104: 678-684.

Miller, T. P., Grogan, T. M., Dahlberg, S., Spier, C. M., Brazier, R. M., Banks, P. M., Foucar, K., Kjeldsberg, C. R., Levy, N., Nathwani, B. N., Schnitzer, B., Tubbs, R. R., Gaynor, E. R., Fisher, R. I. (1994): Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 83: 1460-1466.

Nicklas, R. B., Mitosis, *Adv. Cell Biol.* 2 (1971):225-97.

Nielsen, B. S., Timshel, S., Kjeldsen, L., Sehested, M., Pyke, C., Borregaard, N., Dano, K. (1996): 92kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int. J. Cancer* 65: 57-62.

Okamoto, M., Takahashi, H., Yao, K., Inagi, K., Nakayama, M., Nagai, H. (2002): Clinical impact of using chemoradiotherapy as a primary treatment for hypopharyngeal cancer. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 547: 11-4.

Parsons, J.T., Mendenhall, W. M., Stringer, S. P. et al. (2002): Squamous cell carcinoma of the oropharynx: surgery, radiation therapy or both. *Cancer* 94: 2967-2980.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferley, J., Pisani, P. (2005): Global cancer statistics 2002 CA. *Cancer* 55: 74-108.

Peto, R., Peto, J. (1972): Asymptotically efficient rank invariant test procedure. *J. Roy. Statist. Soc.* 135: 185-207.

Porschen, R., Lohe, B., Hengels, K. J., Borchard, F. (1989): Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67: correlation with pathohistologic criteria and influence of radiation. *Cancer* 64: 2501-2505.

Quinn, C. M., Wright, N. A. (1990): The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J. Pathol.* 160: 93-102.

Ritchie, J. M., Smith, E. M., Summersgill, K. F., Hoffmann, H. T., Wang, D., Klusmann, J. P., Turek, L. P., Haugen, T. H. (2003): Human papilloma virus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int. J. Cancer* 144: 336-344.

Rovensky, Y. A. (1998): Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion. *Biochemistry (Mosc.)* 63: 1029-43.

Roland, N. J., Caslin, A. W., Bowie, G. L., Jones, A. S. (1994): Has the cellular proliferation marker Ki 67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Oto-Laryngol.* 19: 13-18.

Rudolph, P., Knuchel, R., Endl, E., Heidebrecht, H. J., Hofstader, F., Parwaresch, R. (1998): The immunohistochemical marker Ki-S2: cell cycle kinetics and tissue distribution of a novel proliferation-specific antigen. *Mod. Pathol.* 5: 450-6.

Rudolph, P., Alm, P., Heidebrecht, H. J., Bolte, H., Ratjen, B., Baldetorp, B., Ferno, M., Olsson, H., Parwaresch, R. (1999): Immunologic proliferation marker K-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 271-8.

Sahin, A. A., Ro, J. Y., El-Naggar, A. K., Wilson, P. L., Teague, K., Blick, M., Ayala, A. G. (1991a): Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *Am. J. Clin. Pathol.* 96: 512-519.

Sahin, A. A., Ro, J., Ro, J. Y., Blick, M. B., El-Naggar, A. K., Ordonez, J. G., Fritsche, H. A., Smith, T. L., Hortobagyi, G. N., Ayala, A. G. (1991b): Ki-67 immuno-staining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 68: 549-557.

Sampson, S. A., Kreipe, H., Gillet, C. E., Smith, C. E., Smith, P., Chaudary, M. A., Kahn, A., Wicks, K., Parwaresch, R., Barnes, D. M. (1992): Ki-S1- a novel monoclonal antibody which recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. *J. Pathol.* 168: 179-185.

Sasaki, K., Murakami, T., Kawasaki, M., Takahashi, M. (1987): The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J. Cell. Physiol.* 133: 579-584.

Satoh, K., Ohtani, H., Shimosegawa, T., Koizumi, M., Sawai, T., Toyota, T. (1994): Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 107: 1488-1495.

Schuller, D. E., Gacula, J. C., Agrawal, A., Rhoades C. A., Orr, D. A., Young, D. C., Malone, J. P., Merz, M. (2002): Multimodal intensification therapy for previously untreated advanced resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx or hypopharynx. *Cancer* 94: 3169-3178.

Schultze-Mosgau, S., Grabenbauer, G. G., Wehrhahn, F., Radespiel-Tröger,

M., Wiltfang, J., Sauer, R., Rödel, F. (2002): Histomorphologische Strukturveränderungen von Kopf-Hals-Gefäßen nach prä- oder postoperativer Radiotherapie. *Strahlenther. Oncol.* 178: 299-306.

Shepherd, N. A., Richman, P. I., England, J. (1988): Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J. Pathol.* 155: 1213-1219.

Sherr, C. J. (1996): Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.

Shi, S. R., Key, M. E., Kalra, K. L. (1991): Antigen-retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748.

Shi, S. R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R. J., Taylor, C. R. (1995): Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 193-201.

Shima, I., Sagaguri, Y., Kusukawa, J., Nakano, R., Yamana, H., Fujita, H., Kakegawa, T., Morimatsu, M. (1993): Production of matrix metalloproteinase 9 (92kd-gelatinase) by human oesophageal squamous cell carcinoma in response to epidermal growth factor. *Br. J. Cancer* 67: 721-727.

Simon, C. Plinkert, P.K., Universitätsklinik Heidelberg (2006): *HNO* 54: 588-590.

Sobin, L.H., Wittekind, C. (eds). UICC (1997): *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley and Sons, Inc.: New York.

Stahle-Bäckdahl, M., Parks W. C. (1993): 92-kd gelatinase is actively expressed

by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 142: 995-1000.

Sternlicht, M., Werb, Z., (2001): How Matrix Metallo Proteinases regulate Cell behavior. Department of anatomy, University of California, San Francisco
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17: 463-516.

Stetler-Stevenson, W. G., Aznaavorian, S., Liotta, L. A. (1993): Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol* 9: 541-573.

Sturgis, E. M., Moore, B. A., Glisson, B. S., Kies, M. S., Shin, D. M., Byers, R. M. (2005): Neoadjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue in young adults: A case series. *Head Neck* 27.

Tanaka, S., Hirano, M., Sato, K., Sanada, T. 1992: Treatment of carcinoma of the hypopharynx and esophagus. *Treatment of hypopharyngeal carcinoma. J. Jpn. Bronch. Soc.* 43: 88-95.

Taylor, C. R., Shi, S. R., Chaiwun, B., Young, L., Imam, S. A., Cote, R. J. (1994): Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin-sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum. Pathol.* 25: 263-270.

Thompson, M. P., Kurzrock, R. (2004): Epstein Barr Virus and Cancer. *Clin. Cancer Research* Vol. 10: 803-821.

Tiemann, M., Claviez, A., Luders, H., Zimmermann, M., Schellong, G., Dorffel,

W., Parwaresch, R. (2005): Proliferation characteristics in pediatric Hodgkin`s lymphoma point to a cell cycle arrest in the G (1) phase. *Mod. Pathol.*

Tsujihashi, H., Nakanishi, A., Mathsuda, H., Uejima, S., Kurita, T. (1991): Cell proliferation of human bladder tumors determined by BRDURD and Ki-67 immunostaining. *J. Urol.* 145: 846-849.

Werner, J. A., Dünne, A. A., Myers, J. N., (2003): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Exp. Metastasis.* 4: 275-284.

Werner, J. A., Dünne, A. A., Kaiser, U., Kùlkens, C., Lippert, B., Moll, R., Neubauer, A., Ramaswamy, R., Staar, S. (2002): Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. *Onkologie und Differenzialdiagnostik*, Springer-Verlag Berlin: 58-59.

Wiesmeth, A., Wollenberg, B. (2003): Oropharynx Tumoren, Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München, MANUAL: 192-196.

Wintzer, H. O., Zipfel, I., Schulte-Mönting, J., Hellerich, U., von Kleist, S. (1991): Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 67: 421-428.

Wittekind, C., Greene, F. L., Hutter, R. V. P., Klimpfinger, M. (2006): Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren.

Worden, F. P., Kumar, B., Lee, J. S., Wolf, G. T., Cordell, K. G., Taylor, J. M., Urba, S. G., Eisbruch, A., Teknos, T. N., Chepeha, D. B., Prince, M. E., Tsien, C. I., D´Silva, N. J., Yang, K., Kurnit, D. M., Mason, H. L., Miller, T. H., Wallace, N. E., Bradford, C. R., Carey, T. E. (2008): Chemoselection as a strategy for

organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J. Clin. Oncol.* 26(19): 3138-46.

Worral, S. F. (1995): Oral cancer incidence between 1971 and 1989. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33: 195-196.

Yokoshima, K., Nigauri, T., Kamata, S., Kawabata, K., Hoki, K., Mitani, H., Yoshimoto, S. (1999) : New classification of stage IV squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Auris Nasus Pharynx* 26: 311-316.

Yonemura, Y., Kumura, H., Ooyama, S., Kamata, T., Yamaguchi, A., Matsumoto, H., Ninomiya, I., Miyazaki, I. (1991): Immunocytochemical staining of proliferating cells in endoscopically biopsied tissues of gastric carcinomas with monoclonal antibody Ki-67. *Oncology* 48: 162-165.

Zeng, Z. S., Guillem, J. G. (1995): Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancers and liver metastases. *Br. J. Cancer* 72: 575-582.

7. ANHANG

TNM Klassifikation und histopathologisches Grading (Wittekind et al., 2006)

Allgemein gilt:

TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T-Klassifikation Oropharynxkarzinom:

T0: kein Anhalt für Primärtumor

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumor von 2cm oder weniger in größter Ausdehnung

T2: Tumor von mehr als 2cm jedoch weniger als 4cm in größter Ausdehnung

T3: Tumor von mehr als 4cm in größter Ausdehnung

T4: Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z. B. Mm. Pterygoidei, Unterkiefer, harten Gaumen, Zungenmuskulatur, Larynx

N-Klassifikation Oropharynxkarzinom:

NX : regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 : keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 : Metastase in solidärem ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung

N2a: Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten mit mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in grösster Ausdehnung

N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in grösster Ausdehnung

N2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in grösster Ausdehnung

N3 : Metastase(n) in Lymphknoten mit mehr als 6 cm in grösster Ausdehnung

M-Klassifikation:

Die M-Klassifikation gibt Auskunft über das Fehlen (M0) oder Vorhandensein (M1) von Fernmetastasen.

Histopathologisches Grading (Wittekind et al., 2006)

G1: gut differenziert (zytologische Differenzierung in Basalzellen, ausreifende Plattenepithelzellen, gut entwickelte Interzellularbrücken, deutliche Verhornung, nur gering ausgeprägte Malignitätskriterien mit minimaler Kernpleomorphie)

G2: mäßig differenziert (weniger ausgeprägte Interzellularbrücken, geringere Verhornung, mittelgradige Kernpleomorphie)

G3: schlecht differenziert (Interzellularbrücken und Verhornung nur spärlich oder fehlend, zytologische Malignitätskriterien wie Kernpleomorphie sind stark ausgeprägt)

G4 (nicht von allen Autoren verwendet): undifferenziert (Karzinom ohne jede plattenepitheliale Differenzierung, hochgradig ausgeprägte zytologische Malignitätskriterien).

Tumorstadieneinteilung nach der UICC (Union Internationale Contre le Cancer, Hermanek et al., 1987 u. 1992)

Stadium 1: T1N0M0; Stadium 2: T2N0M0; Stadium 3: T3N0M0 oder T1/2/3N1M0; Stadium 4A: T4N0/1M0 oder jedes T N2M0; Stadium 4B: jedes T M3N0; Stadium 4C: jedes T jedes N M1

Anatomische Begrenzungen des Oropharynx

Die Grenzen des Oropharynx werden vom weichen Gaumen bis zu einer Horizontallinie, die durch den oberen Rand der Epiglottis verläuft, gebildet,

wobei seine Grösse von der Stellung des weichen Gaumens und der Zunge abhängig ist. Dem Oropharynx zugehörig sind der vordere und hintere Gaumenbogen, die Gaumenmandeln, die Tonsilla lingualis, der Isthmus faucium, begrenzt von den beiden Gaumenbögen, dem weichen Gaumen und der Zunge, sowie der Isthmus pharyngis, welcher mittels des weichen Gaumens den Oropharynx zum Nasopharynx abgrenzt.

Zellzyklus

Alle Zellen durchlaufen als morphologisches Korrelat einer Zellteilung einen Intermitose- und einen Mitosezyklus. Bei der Mitose handelt es sich um die eigentliche Zellteilungsphase, sie ist untergliedert in fünf weitere Phasen, und zwar in die Prophase, die Prometaphase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase. Hierauf folgt die Zytokinese, die cytoplasmatische Teilung. Bei tierischen Zellen beträgt die Mitosedauer wenige Stunden, bei pflanzlichen Zellen ca. drei Stunden (Nicklas, 1971). An die Mitose schliesst sich der Intermitosezyklus mit den Phasen G1, S, G2 sowie G0 (Dazynekiewicz et al., 1982) an. In der G1-Phase produziert die in der Mitose neu entstandene Zelle Proteine für den Aufbau von Zytoplasmastrukturen, in der S-Phase wird das genetische Material durch Replikation verdoppelt, die G2-Phase leitet wieder in die Mitose über. Aus der G1-Phase kann die Zelle in die G0-Phase, eine Ruhephase übergehen. Aus dieser Phase kann die Zelle durch bestimmte Proliferationsreize wieder in den Zellzyklus eintreten (Gerdes et al., 1984a; Quinn und Wright, 1990). Erhält eine Zelle keine natürliche Aktivierung durch die mitotischen Proliferationsreize, sondern durch onkogene Reize, so kommt es bei ihr nicht zur natürlichen Ausdifferenzierung (Sherr et al., 1996).

8. Lebenslauf

Name	Michaela Ax	
Adresse	Luxemburger Strasse 226 50937 Köln	
Geburtsdatum	20.03.1973	
Geburtsort	Siegen	
Eltern	Mutter: Brigitte Ax, geb. Jung, geb. 30.12.1944, Einzelhandelskauffrau Vater: Artur Ax, geb. 30.08.1941, Fahrdienstleiter	
Kind	Lilli Ax, geb. 26.04.2005	
Schulausbildung	1979-1983	Grundschule Wilnsdorf
	1984-1989	Realschule Wilnsdorf
Berufsausbildung und -tätigkeit	1989-1999 Arzthelferin	
Hochschulreife	Februar 1996 bis Dezember 1998 Siegerland- Kolleg	
Medizinstudium	1999 bis 2004 Philipps-Universität Marburg, Oktober 2005 bis Mai 2006 Universität zu Köln	

Staatliche Prüfungen	August 2001	Ärztliche Vorprüfung
	August 2002	1. Staatsexamen
	August 2004	2. Staatsexamen
	Mai 2006	3. Staatsexamen
Praktisches Jahr	Wahltertial: Oktober 2004 bis Februar 2005, Klinik für Neurologie des Klinikum Leverkusen,	
	Innere-Tertial: Februar 2005 bis Juni 2005, Klinik für Allgemeine Innere des Klinikum Leverkusen,	
	Chirurgie-Tertial: Oktober 2005 bis Februar 2006 , Klinik für Unfall-, Gefäß- und Allgemeinchirurgie des Klinikum Leverkusen	
Berufliche Tätigkeit	seit 01.07.2006 Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie des Klinikum Leverkusen (Direktor: Priv. Doz. Dr. H.-L. Lagrèze)	

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. A. Werner, Direktor des Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie den unterstützenden Rat bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. Teymoortash, leitender Oberarzt am Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Philipps-Universität Marburg, für die Überlassung des Themas und die intensive Korrekturarbeit sowie den unterstützenden Rat bei dieser Arbeit.

Vielmals danke ich dem Institut für Hämatopathologie der Universitätsklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. H. Wacker) unter der ehemaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Parwaresch (gest. 01.11.2005), für die freundliche Bereitstellung der Antikörper, die konstruktiven Ratschläge sowie die intensive Hilfe bei der Auswertung und Beurteilung der Präparate.

Danken möchte ich außerdem Frau M. Hauberg, medizinisch technische Assistentin am Institut für Hämatopathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Einführung in die Methodik der Immunhistochemie.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Moll, Direktor des Instituts für Pathologie sowie Frau Dr. A. Ramaswamy, Oberärztin am Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg für die histopathologische Begutachtung und Einteilung des Grading für das verwendete Tumormaterial.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn PD Dr. A. Sesterhenn, Oberarzt am Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Philipps-Universität Marburg und Herrn PD Dr. R. Mandic, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Philipps-Universität Marburg sowie Frau Dr.

C. Kuropkat, ehemalige Mitarbeiterin am Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Philipps-Universität Marburg, für die Unterstützung bei der Erhebung klinischer Daten und für die Hilfsbereitschaft und Betreuung während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau. R. Peldzus und Frau G. Sadowski, medizinisch technische Assistentinnen des im onkologischen Labors des Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, für die vielen wertvollen Ratschläge für diese experimentelle Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Strauch, Institut für Biometrie und Informatik der Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schäfer für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. J. Terpe, Direktor des Instituts für Pathologie des Klinikum Leverkusen für die Unterstützung bei der Anfertigung der Abbildungen der histologischen Präparate.

Vielmals bedanken möchte ich mich bei meinem Freund C. Glinski für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir stets mit Ermutigung und größter Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit zur Seite standen.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Bestimmung der Proliferationsaktivität von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx: Eine histochemische Untersuchung mit den monoklonalen Antikörpern Ki-S2 und Ki-S11 und der Metalloproteinase 9“ in der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Teymoortash ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Köln, den

.....

Michaela Ax

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

**Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Universitätsprofessoren/-innen und Dozenten/-innen**

Marburg:

Arnold	Happle	Remschmidt
Aumüller	Hasilik	Renz
Bach	Hellinger	Röhm
Barth	Hofmann	Schäfer
Basler	Jungclas	Schmidt
Baum	Kern	Seitz
Christiansen	Klenk	Seyberth
Daut	Koolmann	Szlenczka
Eilers	Kretschmer	Steiniger
Feuser	Krieg	Suske
Fruhsdorfer	Kroll	Vohland
Geus	Lammel	Voigt
Gotzen	Lang	Weihe
Griss	Moll	Werner
Grzeschik	Mutters	Westermann
Gudermann	Oertel	Wulf

Köln:

Klose	Päffgen	Seiffert
Lagrèze	Ringe	Vestweber